

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA LÚCIA DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E
FISIOLÓGICA DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE**
Acanthamoeba

**CURITIBA
2010**

JULIANA LÚCIA DUARTE

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E
FISIOLÓGICA DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE**
Acanthamoeba

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Área de Concentração: Parasitologia. Departamento de Patologia Básica. Setor de Ciências Biológicas do Campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Oliveira Costa,

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giseli Klassen

**CURITIBA
2010**

AGRADECIMENTOS

- A DEUS...

Uma noite eu tive um sonho...
Sonhei que estava andando na praia com o Senhor
e através do Céu, passavam cenas da minha vida.
Para cada cena que se passava, percebi que eram deixados
dois pares de pegadas na areia;
Um era meu e o outro do Senhor.
Quando a última cena da minha vida passou
diante de nós, olhei para trás, para as pegadas
na areia e notei que muitas vezes, no caminho da
minha vida havia apenas um par de pegadas na areia.
Notei também, que isso aconteceu nos momentos
mais difíceis e angustiantes do meu viver.
Isso entristeceu-me deveras, e perguntei
então ao Senhor.
"- Senhor, Tu me disseste que, uma vez
que eu resolvi seguir-te, tu andarias sempre
comigo, todo o caminho. Contudo, notei que
durante as maiores atribulações do meu viver
havia na areia dos caminhos da vida,
apenas um par de pegadas. Não compreendo
porque nas horas em que mais necessitava de ti,
Tu me deixaste sozinho."
O Senhor me respondeu:
"- Meu querido filho. Eu te amo e
jamais te deixaria nas horas de provação
e sofrimento.
Quando viste na areia, apenas um par
de pegadas, foi exatamente aí que nos braços te carreguei."

...POR TER ESTADO SEMPRE COMIGO, EM TODO O MEU CAMINHO!

A todos que estiveram presente neste momento da minha vida:

- À minha orientadora, professora Dra. Adriana Oliveira Costa, a quem dedico toda a minha admiração, obrigada pelos seus ensinamentos, sua orientação, presença, dedicação e paciência comigo durante toda a realização deste trabalho.
- Ao Laboratório de Protozoologia, e a todos os colegas do laboratório.
- À minha co-orientadora, professora Dra. Giseli Klassen, quem abriu as portas da Pós Graduação para mim, obrigada por ter me recebido com tanto carinho. Agradeço também, toda a sua orientação durante a realização deste trabalho.
- Ao Laboratório de Epigenética, e às meninas (Ednéia, Camila e Vanessa) por toda ajuda, apoio, incentivo e amizade.
- À professora Dra. Débora, que apareceu em meu caminho como um anjo em um momento bastante difícil e abdicou de seus próprios afazeres para auxiliar na realização e na orientação deste trabalho.
- À Dra. Cinthia furst Leroy Gomes, pela doação das amostras utilizadas e pela colaboração com nosso projeto. Ao Dr. Fernando Costa e Silva Filho, pela gentileza de doar as amostras que foram utilizadas como controle em nossos experimentos.
- Ao Departamento de Bioquímica, principalmente ao funcionário Valter, pelo auxílio e incentivo durante a realização do sequenciamento gênico dos isolados.
- Ao professor Valter Boeger, por ter permitido a utilização do laboratório de zoologia para alguns experimentos, e aos colegas do laboratório, pelo auxílio.
- À minha mãe e meu pai, as pessoas mais importantes da minha vida! Obrigada pela minha vida e por todo o seu amor.
- À minha irmã, Lucene, a quem considero minha segunda mãe e ao nosso querido Leozinho, que amo tanto. Agradeço por todo apoio, amor e carinho e por serem tão importantes na minha vida.
- Ao meu irmão, sua esposa e aos meus sobrinhos Higor e Thomas, as relíquias da minha vida. Obrigada pelos momentos de felicidade!
- A todos os colegas do mestrado, pelo apoio, carinho, incentivo, companheirismo e pela belíssima amizade que representam. Agradeço principalmente aos amigos: Ju e Paulo, a amizade de vocês foi um grande presente na minha vida. Por vocês eu sei que tudo valeu à pena!
- Ao meu namorado Giu, também meu colega de mestrado. Obrigada por ter entrado na minha vida. A você agradeço pelos meus momentos mais felizes!
- Ao programa de Pós Graduação, que viabilizou a realização deste trabalho!
- E à CAPES pelo incentivo financeiro!

O meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

As amebas do gênero *Acanthamoeba* são denominadas anfitriônicas por sua capacidade de viver tanto na forma de vida livre quanto como parasitas de vertebrados, causando infecções graves como a Encefalite Amebiana Granulomatosa e a ceratite amebiana em humanos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba* obtidas na cidade de Vitória-ES, por análise morfológica, molecular e fisiológica. Para os estudos foram utilizadas quatro amostras clínicas obtidas de raspado de córnea de pacientes com ceratite amebiana (AR, ALX, LG, e WAL) e quatro amostras ambientais isoladas do ambiente doméstico de um destes pacientes (AR11, AR12, AR14 e AR15). Os isolamentos foram realizados em meio ágar soja contendo bactérias (*Escherichia coli*) e as culturas foram posteriormente submetidas à axenização em meio proteose-extrato de levedo - peptona (PYG) suplementado com 10% de soro bovino fetal. Duas amostras ambientais de ambiente hospitalar (OPH e ICU) e duas cepas de *Acanthamoeba* do *American Type Culture Collection* (ATCC), uma caracterizada como patogênica (AP2-ATCC 30461) e outra como não patogênica (AP4-ATCC 30872), foram incluídas para comparação. A confirmação do gênero *Acanthamoeba* foi realizada por análise da morfologia e tamanho dos cistos e por PCR para amplificação de uma região conservada do gene 18S rDNA. A identificação genotípica foi realizada pelo agrupamento dos isolados nos genótipos determinados por Stothard et al (1998), por meio do sequenciamento da região ASA.S1 do gene 18S rDNA. Ensaio fisiológico de termotolerância (28 °C, 37 °C e 42 °C) e de osmotolerância (0,1 M, 0,5 M, e 1,0 M de manitol) foram utilizados para avaliar a patogenicidade dos isolados, sendo aplicados nas culturas em ágar soja e adaptados para culturas axênicas. Os isolados foram confirmados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, sendo que nove apresentaram características morfológicas do grupo II e um do grupo I de Pussard e Pons (1977). O sequenciamento parcial do gene 18S rDNA revelou uma frequência de 100% do genótipo T4 nos isolados clínicos (AR, ALX, LG, WAL e AP2). Dos isolados ambientais sequenciadas três foram do genótipo T4 (AR11, AR14 e AP4) e dois do genótipo T11 (AR15 e OPH). Nos ensaios de termotolerância, nos dois sistemas de cultivo, os isolados clínicos e ambientais cresceram até 37 °C, ou seja, em temperatura que lhe permitiriam sobreviver no organismo humano. Os testes de osmotolerância indicaram crescimento até a concentração de 0,5 M de manitol para a maioria dos isolados em meio ágar soja, porém não houve correspondência com os dados obtidos em cultivo axênico, em que maioria não cresceu nesta osmolaridade. Apenas um isolado (ALX) manteve-se viável em meio ágar soja contendo 1,0 M de manitol, condição que tem sido usada por outros autores como discriminante de patogenicidade, e somente os isolados AP2 e AP4 resistiram a esta osmolaridade em cultivo axênico. Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram a predominância do grupo morfológico II e do genótipo T4 de isolados de *Acanthamoeba*, conforme tem sido registrado na literatura e indicaram que os testes de termotolerância e osmotolerância podem não ser adequados para avaliar o potencial patogênico do protozoário.

Palavras-chave: Amebas de vida Livre, *Acanthamoeba*, Sequenciamento gênico, Osmotolerância, Termotolerância.

ABSTRACT

Acanthamoeba species are called amphizoic amoebas, since they are able to survive either as free living organisms or as parasitic of vertebrates. They can cause severe infections as granulomatous amebic encephalitis or *Acanthamoeba* keratitis in humans. The aim of the present study was to characterize clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* from Vitória, Espírito Santo, Brazil, using morphological, molecular and physiological assays. Four clinical samples from corneal scrapings of keratitis cases (AR, ALX, LG and WAL) and four environmental samples obtained from dust inside the residence of one of the patients (AR11, AR12, AR14 e AR15) were used in the experiments. All samples were isolated in soy agar with *Escherichia coli*. Cultures were also subjected to axenization in Proteose –Yeast extract – Peptone (PYG) medium supplemented with 10 % fetal calf serum. Two environmental samples obtained from hospital dust (OPH and ICU) and two ATTC strains (*American Type Culture Collection*) characterized as pathogenic (AP2 - ATCC 30461) and non-pathogenic (AP4 - ATCC 30872) were included in the study for comparison. The confirmation of *Acanthamoeba* genera was performed by morphological analysis and PCR to amplify a region of 18S rDNA. Genotyping was done by sequencing of ASA-S1 fragment of 18S rDNA and comparison with sequences described by Stothard et al (1998). To evaluate the pathogenic potential of the isolates, thermotolerance (28 °C, 37 °C and 42 °C) and osmotolerance (0.1 M, 0.5 M and 1.0 M mannitol) assays were realized with soy agar cultures and also with axenized trophozoites. All isolates were confirmed as belonging to *Acanthamoeba* genera, with nine from morphological group II and one from group I. Genotyping by sequency analysis indicated that all clinical samples (AR, ALX, LG, WAL and AP2) were from T4 genotype, as well as three environmental samples (AR11, AR14 and AP4). Two environmental samples belonged to T11 genotype (AR15 and OPH). Thermotolerance assays indicated that the isolates are able to grow at the physiological temperature of 37°C, either in soy agar as in axenic system. Most of the isolates in soy agar grew at 0.5 M, but only ALX supported 1.0 M, a condition that has been used by several researchers as limiting to non-pathogenic isolates. Axenic cultures did not present the same osmotolerance observed in the soy agar cultivation, most of them did not grow even at 0.5 M, and only two isolates (AP2 and AP4) were able to survive at 1.0 M mannitol. In conclusion, the predominance of morphological group II and T4 genotype was confirmed in the present work, as it has been described by other authors. Furthermore, the thermo and osmotolerance of *Acanthamoeba* may not be adequate assays to predict pathogenic potential.

Key words: Free living organisms, *Acanthamoeba*, Sequency analysis, Osmotolerance, Thermotolerance.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Olhos avermelhados, lacrimejamento, inflamação da córnea, infiltrado inflamatório estromal em forma de anel em casos de ceratite por <i>Acanthamoeba</i> (Fonte: VISVESVARA et al, 2007).	20
Figura 2: <i>Acanthamoeba castellanii</i> , trofozoíto (a), cisto (b). n: núcleo; cv: vacúolo contrátil (Fonte: VISVESVARA et al, 2007).	22
Figura 3: Fotomicrografia mostrando cistos de <i>Acanthamoeba</i> (isolado AR), após 72 horas de cultivo, em meio ágar soja com <i>Escherichia coli</i> . Aumento: 400 X.	39
Figura 4: Fotomicrografia mostrando as diferenças morfológicas dos cistos de isolados clínicos e ambientais de <i>Acanthamoeba</i> isolados em meio ágar soja com <i>Escherichia coli</i> e observados em microscópio óptico comum. AR, WAL, LG, ALX: Isolados clínicos obtidos de lesão de ceratite amebiana; AR11, AR12, AR14, AR15: Isolados ambientais obtidos de poeira doméstica; OPH e ICU: Isolados obtidos de ambiente hospitalar. Aumento: 1000 X.	41
Figura 5: Produtos de amplificação por PCR de fragmento do gene parcial 18S rDNA (KHAN e PAGET, 2002) de amostras clínicas e ambientais de <i>Acanthamoeba</i> em cultivo em ágar soja com <i>Escherichia coli</i> . Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. M: Marcador 1Kb. B: Branco. AR, WAL, LG, ALX: Isolados clínicos obtidos de lesão de ceratite amebiana; AR11, AR12, AR14, AR15: Isolados ambientais obtidos de poeira doméstica.	41
Figura 6: Fotomicrografia mostrando trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> (isolado OPH), em meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal, com 72 horas de cultivo. Aumento: 400 X.	42
Figura 7: Produtos de amplificação por PCR do fragmento ASA. S1 do gene 18S rDNA, de amostras clínicas e ambientais de <i>Acanthamoeba</i> em cultivo axênico. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. M: Marcador 100bp. B: Branco. AR, WAL, LG, ALX: Isolados clínicos obtidos de lesão de ceratite amebiana; AR11, AR12, AR14, AR15: Isolados ambientais obtidos de poeira doméstica; OPH e ICU: Isolados ambientais obtidos de hospital. AP2: Isolado clínico obtido de lesão de ceratite amebiana (ATCC30461); AP4: Isolado ambiental obtido de água (ATCC30872).	43

- Figura 8.** Cinética de crescimento de culturas clonadas de *Acanthamoeba* nas temperaturas de 28 °C e 37 °C, em meio ágar soja com bactérias (*Escherichia coli*). O crescimento máximo na placa corresponde a 4 cm. **47**
- Figura 9.** Cinética de crescimento de culturas clonadas de *Acanthamoeba* nas temperaturas de 28 °C, 37 °C e 42 °C, em 2,5 mL de meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal. **48**
- Figura 10.** Cinética de crescimento de culturas clonadas de *Acanthamoeba* na temperatura de 28 °C em placa de meio ágar soja com bactérias (*Escherichia coli*), contendo 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M de manitol. O crescimento máximo na placa corresponde a 4 cm. **50**
- Fig. 11:** Cinética de crescimento de culturas clonadas de *Acanthamoeba* na temperatura de 28 °C, em 2,5 mL de meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal e contendo 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M de manitol. **52**

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Classificação das principais espécies de <i>Acanthamoeba</i> de acordo com os grupos morfológicos descritos por Pussard e Pons (1977) *	24
Tabela 2: Integração entre grupos morfológicos (PUSSARD e PONS, 1977) e genótipos (STOTHARD et al, 1998), utilizados em estudos de caracterização genotípica de <i>Acanthamoeba</i> .	25
Tabela 3: Isolados de <i>Acanthamoeba</i> obtidos de raspado de córnea e de poeira de diferentes ambientes.	30
Tabela 4: Espécies de <i>Acanthamoeba</i> utilizadas como referência para os estudos de genotipagem (STOTHARD et al, 1998).	36
Tabela 5: Aspectos morfológicos dos cistos e agrupamento dos isolados originais clínicos e ambientais de <i>Acanthamoeba</i> , cultivados em meio ágar soja.	40
Tabela 6: Porcentagem de similaridade obtida entre os isolados clonados de <i>Acanthamoeba</i> e as cepas de referência utilizadas na genotipagem de Stothard et al (1998).	44
Tabela 7: Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre os isolados e as sequências de espécies publicadas no <i>Genbank</i> (banco de sequências nucleotídicas do NCBI). AR, WAL, LG, ALX: Isolados clínicos obtidos de lesão de ceratite amebiana; AR11, AR14, AR15: Isolados ambientais obtidos de poeira doméstica; OPH: isolado ambiental obtido de ambiente hospitalar.	45
Tabela 8: Número de nucleotídeos diferentes encontrados entre os isolados de <i>Acanthamoeba</i> , pela análise das distâncias par a par de diferenças nucleotídicas, utilizando o programa MEGA 3 (KUMAR et al, 2004), a partir das sequências obtidas pelo sequenciamento parcial do gene 18S rDNA. AR, WAL, LG, ALX: Isolados clínicos obtidos de lesão de ceratite amebiana; AR11, AR14, AR15: Isolados ambientais obtidos de poeira doméstica.	46
Tabela 9. Taxa média de crescimento das culturas de <i>Acanthamoeba</i> em ágar soja com bactérias nas temperaturas de 28 °C, 37 °C e 42 °C.	47
Tabela 10. Taxa média de crescimento de culturas axênicas de <i>Acanthamoeba</i> com inóculo de 10 ⁵ trofozoítos por mL, em 2,5 mL de meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal, nas temperaturas de 28 °C, 37 °C e 42 °C.	49

Tabela 11. Taxa média de crescimento das culturas de <i>Acanthamoeba</i> em ágar soja com bactérias na temperatura de 28 °C, em meio contendo manitol a 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M.	51
Tabela 12. Taxa média de crescimento das culturas de <i>Acanthamoeba</i> em meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal, à temperatura de 28 °C, em meio contendo manitol a 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M.	53
Tabela 13. Termotolerância e osmotolerância dos isolados clonados de <i>Acanthamoeba</i> em meio ágar soja (AS) e em cultivo axênico (Ax) no meio PYG suplementado com 10% de soro fetal bovino.	54

LISTA DE SIGLAS

AIDS	- <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AS	-Ágar soja
ASA.S1	- <i>Acanthamoeba specific amplimer S1</i>
Ax	-Axênico
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
AVL	-Amebas de vida livre
BLAST	- <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CA	-Ceratite amebiana
DNA	-Ácido desoxirribonucléico
DNA_r	-DNA ribossomal
dNTP	-Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EAG	-Encefalite Amebiana Granulomatosa
ITS1	-Regiões inter-espaçadora dos eucariotos (18S – 5,8S)
log	-Logaritmo
MAP	-Meningoencefalite Amebiana Primária
MgCl₂	-Cloreto de Magnésio
mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
N₀	-Número de trofozoitos do inóculo inicial
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NT	-Densidade máxima de trofozoitos
Pb	-Pares de base
PCR	- Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase chain reaction</i>)
pH	- Potencial hidrogeniônico
PYG	-Peptona, extrato de levedura e glicose
RAPD	- <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	- <i>Restriction Fragment length polymorphism</i>
rRNA	-Ácido ribonucléico ribossômico
T	-Tempo em que foi atingida a densidade máxima

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Histórico	15
2.2 Gênero <i>Acanthamoeba</i> : Distribuição e importância	16
2.2.1 Ubiquidade de <i>Acanthamoeba</i>	16
2.2.2 <i>Acanthamoeba</i> como carreadora de bactérias	17
2.2.3 Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i>	17
2.2.3.1 Infecções sistêmicas	17
2.2.3.2 Ceratite amebiana	19
2.3 Ciclo de vida e morfologia de <i>Acanthamoeba</i>	21
2.4 Classificação morfológica e genotípica de <i>Acanthamoeba</i>	23
2.5 Potencial patogênico de <i>Acanthamoeba</i>	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Identificação dos isolados clínicos e ambientais de <i>Acanthamoeba</i>	29
4.1.1 Amostras	29
4.1.2 Cultivo dos isolados em sistema polixênico (meio ágar soja)	31
4.1.3 Identificação dos isolados por critérios morfológicos	31
4.1.4 Confirmação do gênero pela PCR (KHAN e PAGET, 2002)	31
4.2 Clonagem e axenização dos isolados	32
4.2.1 Clonagem das amebas em meio de cultivo ágar soja	32
4.2.2 Axenização dos isolados e cultivo em meio PYG	33
4.3 Sequenciamento parcial do gene 18S rDNA	33
4.3.1 PCR	33
4.3.2 Purificação do produto de PCR	34
4.3.3 Reação de Sequenciamento	34
4.3.4 Análise das sequências de DNA	35

4.3.5 Genotipagem de <i>Acanthamoeba</i>	35
4.4 Ensaios de termotolerância e osmotolerância	37
4.4.1 Termotolerância	37
4.4.2 Osmotolerância	38
4.4.3 Análise dos dados	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Classificação dos isolados originais de <i>Acanthamoeba</i> por análise morfológica	39
5.1.1 Morfologia e características de crescimento dos isolados do gênero <i>Acanthamoeba</i>	39
5.1.2 Agrupamento dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> por critérios morfológicos	40
5.1.3 PCR para confirmação do gênero (KHAN e PAGET, 2002)	41
5.2 Clonagem e axenização das culturas	42
5.3 Determinação de genótipos por sequenciamento parcial do gene 18S rDNA dos isolados clonados de <i>Acanthamoeba</i>	42
5.3.1 Dados gerais do sequenciamento	42
5.3.2 Classificação genotípica	43
5.3.3 Similaridade entre os isolados de ceratite e ambientais	45
5.4 Ensaios de termotolerância e osmotolerância	46
5.4.1 Termotolerância	46
5.4.2 Osmotolerância	49
5.4.3 Cultivo em meio ágar soja com bactérias versus cultivo axênico	53
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	65
8 PERSPECTIVAS	66
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

As Amebas de Vida Livre (AVL) são protozoários da classe *Rhizopoda* com algumas espécies capazes de infectar vertebrados. São considerados organismos anfizóicos, devido à capacidade de sobreviver tanto em vida livre, quanto como parasitas (PAGE, 1974). *Naegleria fowleri* causa uma infecção de caráter não oportunista denominada Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP), que é fatal na grande maioria dos casos (BUTT, 1966; BUTT et al, 1968). *Sappinia diploidea* foi relatada causando encefalite em indivíduos saudáveis (GELMAN et al, 2001, 2003). Infecções em indivíduos imunocomprometidos por *Balamuthia mandrillaris* têm sido também descritas, determinando o quadro de Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) (VISVESVARA et al, 1993). Esta enfermidade pode adicionalmente ser causada por amebas do gênero *Acanthamoeba*, as quais constituem um dos protozoários mais prevalentes encontrados no ambiente (PAGE, 1967; MERGERYAN, 1991; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, 1994). *Acanthamoeba* é responsável também por outro tipo de infecção, denominada ceratite por *Acanthamoeba* ou ceratite amebiana, que não está associada à imunodepressão (NIEDERKORN et al, 1999). A infecção ocorre devido a um trauma ocular e à contaminação pelo protozoário. Trata-se de uma infecção grave, dolorosa e progressiva, podendo levar à cegueira do paciente, principalmente quando o diagnóstico não é feito corretamente. Apesar de haver casos de ceratite em 10 a 15% de pessoas que não usam lentes de contato, mas que sofreram traumas oculares (STEHR-GREEN et al, 1989; ILLINGWORTH et al, 1995), está claro que o uso de lentes de contato é o principal fator de risco para esta infecção (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004).

A distribuição cosmopolita das amebas do gênero *Acanthamoeba* e sua ubiquidade no meio favorecem o contato com humanos, o que geraria muitas oportunidades para a infecção. Apesar disto, as doenças associadas a este organismo ocorrem geralmente em situações bem específicas, como imunodepressão para as infecções sistêmicas ou lesões prévias na córnea para a ceratite amebiana, mas sua importância vem crescendo devido ao aumento do uso de lentes de contato (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; VISVESVARA et al, 2007).

A caracterização dos isolados por análise genotípica e determinação do seu potencial patogênico é importante para auxiliar a esclarecer se qualquer espécie de *Acanthamoeba* no ambiente apresenta capacidade de se tornar parasita ou se existem

linhagens mais adaptadas para a vida parasitária. No Brasil, a caracterização molecular e de potencial patogênico de isolados do protozoário é restrita a poucos trabalhos, (ALVES et al, 2000, CARLESSO et al, 2010) resultando em um conhecimento limitado sobre genótipos predominantes e risco de infecção por isolados presentes no nosso meio. Por este motivo, o presente trabalho busca acrescentar informações sobre isolados de ceratite amebiana obtidos no Brasil, na cidade de Vitória/ES e de isolados do ambiente, além de aplicar e avaliar ensaios fisiológicos *in vitro* de termotolerância e osmotolerância, que têm sido usados por vários autores na caracterização de patogenicidade de *Acanthamoeba*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

As Amebas de Vida Livre já foram consideradas organismos inofensivos e comensais de mamíferos. Atualmente, são reconhecidas como patógenos emergentes, capazes de causar doenças em humanos e animais (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; VISVESVARA et al, 2007).

O primeiro relato do potencial patogênico das Amebas de Vida Livre ocorreu em 1958, por Culbertson e colaboradores, em testes de triagem para avaliar a segurança da vacina contra poliomielite. Durante estes testes, ratos desenvolveram um quadro de encefalite que os levou ao óbito, após serem inoculados com amebas que haviam contaminado culturas de células utilizadas nos testes da vacina. Estabeleceu-se então as primeiras suspeitas de que Amebas de Vida Livre teriam o potencial de causar doença em humanos.

Os primeiros casos de uma infecção progressiva da córnea causada por amebas de vida livre, denominada ceratite amebiana, foram relatados na Grã Betanha por Nagington et al (1974) e nos Estados Unidos por Jones et al (1975). Em 1980, Martinez e colaboradores reconheceram as infecções sistêmicas por *Acanthamoeba* como oportunistas, devido a sua ligação com pacientes imunocomprometidos, e assim diferenciaram as infecções que são causadas por *Acanthamoeba* spp das que são causadas por *Naegleria*. Sendo assim, *Acanthamoeba* spp foi caracterizada como o patógeno de um quadro de encefalite humana denominada Encefalite Amebiana Granulomatosa ao passo que o termo Meningoencefalite Amebiana Primária refere-se a

uma infecção semelhante, porém de evolução mais rápida, causada por *Naegleria fowleri* (MARTINEZ e VISVESVARA, 1991).

Na década de 80, Visvesvara e seus colaboradores identificaram uma infecção por *Balamuthia mandrillaris* que resultou na morte de um babuíno em um zoológico na Califórnia. Infecções em humanos logo surgiram, envolvendo principalmente indivíduos imunocomprometidos (VISVESVARA e SHER-GREEN, 1990; VISVESVARA et al 1993; ANZIL et al, 1991; ROWEN et al, 1995; DENNEY et al, 1997).

No início do século XXI *Sappinia diploidea* foi descoberta como mais uma Ameba de Vida Livre causadora de encefalite, mas um tipo de encefalite não fatal que acomete principalmente indivíduos saudáveis (GELMAN et al, 2001, 2003).

De fato, doenças humanas causadas por Amebas de Vida Livre, possuem muitos outros relatos na literatura. Essas doenças costumavam ser atribuídas a outros protozoários parasitas e até mesmo a outras amebas e infelizmente a maioria dos casos eram diagnosticados somente após a morte do paciente (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004)

2.2 Gênero *Acanthamoeba*: Distribuição e importância

2.2.1 Ubiquidade de *Acanthamoeba*

As amebas do gênero *Acanthamoeba* estão entre as Amebas de Vida Livre mais encontradas no meio ambiente. Têm distribuição cosmopolita e já foram isoladas nos mais distintos habitats: solo de regiões que variam de tropicais e árticas, poeira, ar (KINGSTON e WARHURST, 1969); em ambientes aquáticos como água do mar, areia da praia, piscinas, águas termais, sistemas de tratamento de esgoto (RIVERA et al, 1989; RIVERA et al 1991); em estabelecimentos de saúde como sistema de ventilação e ar condicionado em hospitais, onde representam um maior perigo de exposição aos pacientes; unidades de tratamento dental (BARBEAU e BUHLER, 2001), unidades hospitalares e de diálise (CASEMORE, 1977), estação de lava-olhos de emergência em laboratórios (PASZKO-KOLVA et al, 1991); em lentes de contato, assim como em seu estojo e nas soluções de limpeza utilizadas na higiene e manutenção (ILLINGWORTH et al, 1995).

Também foram isoladas como contaminantes em culturas de células de mamíferos, de bactérias e leveduras (CASTELLANI, 1930; JAHNES et al, 1957), em

ambientes domésticos, em vasos de flores, aquários, umidificadores e até mesmo na água da torneira e na água do banho (DE JONCKHEERE, 1991; MERGERYAN, 1991; RODRIGUEZ- ZARAGOZA, 1994). Em animais como mamíferos, anfíbios, répteis, e peixes, *Acanthamoeba* pode estar ou não associada à existência de doença (WALOCHNIK et al, 1999). Foi também isolada em mucosa e garganta de humanos assintomáticos e saudáveis (MICHEL et al, 1994).

2.2.2 *Acanthamoeba* como carreadora de bactérias

Estas amebas têm despertado a preocupação de pesquisadores pelo fato de poderem internalizar diferentes espécies de bactéria. Este fato pode representar um problema de saúde pública, considerando que as amebas são resistentes ao processo de cloração da água e podem proteger bactérias fagocitadas, constituindo-se em um reservatório de bactérias para infecções humanas (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SCHEID et al, 2010). *Chlamydia* spp e *Rickettsia* spp foram identificados em *Acanthamoeba* sp obtidas tanto de isolado clínico como ambiental (BIRTLES et al, 1997; HORN et al, 1999), assim como *Legionella* sp (ROWBOTHAM, 1980), *Vibrio cholerae*, (THOM et al, 1992), *Coxiella burnetti* (LA SCOLA e RAOULT, 2001), *Salmonella enterica serovar typhimurium* (GAZE et al, 2001), *Mycobacterium avium* (DANELISHVILI et al, 2007), *Listeria monocytogenes* (ZHOU et al, 2007) dentre várias outras (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003) .

Esta interação entre ameba e bactéria pode resultar em um estado endossimbiótico ou ainda levar a destruição de uma delas ou ambas. As amebas são consideradas predadoras de bactérias e atuam controlando a sua população no solo e em ambientes aquáticos (RODRIGUEZ-ZARAGOZA, 1994; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

2.2.3 Infecções causadas por *Acanthamoeba*

2.2.3.1 Infecções sistêmicas

Até o momento, os tipos de enfermidades sistêmicas associadas a *Acanthamoeba* incluem Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), infecções na nasofaringe, otites, infecções cutâneas e infecções disseminadas. Geralmente estão associadas a indivíduos debilitados por fatores como infecção por HIV, tratamento imunossupressor após transplante de órgãos, alcoolismo, abuso de drogas, tratamento com esteróides,

quimioterapia e radioterapia para câncer e os portadores de outras doenças como diabetes, Lupus Eritematoso Sistêmico, insuficiência renal, cirrose, tuberculose, úlcera na pele e doença de Hodgkin (VISVESVARA et al, 2007; DA ROCHA-AZEVEDO et al, 2009; CHOMICZ et al, 2010). Apesar de a susceptibilidade às infecções estar bastante relacionada à debilidade e supressão imune, casos de EAG têm sido encontrados em crianças e adultos imunocompetentes (SANGRUCHI et al, 1994; SINGHAL et al, 2001; LACKNER et al, 2010).

Contaminação de pele lesionada e epitélio do trato respiratório constituem a porta de entrada para estes protozoários. Nestes casos, a ameba pode se disseminar pela via hematogênica para o Sistema Nervoso Central e para vários órgãos (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004).

A **EAG** é uma doença caracterizada por um quadro infeccioso crônico, lento e progressivo do Sistema Nervoso Central. Está associado a muitas espécies de *Acanthamoeba*. Os sintomas incluem dor de cabeça, anormalidades de comportamento, náusea, vômito, febre, letargia, pescoço rígido, deficiência focal neurológica, hemiparesia e aumento da pressão intracraniana. A patogênese da infecção envolve necrose hemorrágica grave, edema moderado a intenso com lesões multifocais, exsudato crônico inflamatório, vasculite com linfócitos perivasculares. Comumente, trofozoítos podem ser encontrados nos tecidos recobertos por células inflamatórias constituindo a forma granulomatosa típica desta infecção. No entanto, esta forma pode apresentar-se ausente ou pouco nítida em pacientes com resposta imune muito debilitada (MARTINEZ e VISVESVARA, 1994; VISVESVARA et al, 2007).

Para pacientes com sintomas neurológicos, o diagnóstico pode ser citopatológico, utilizando amostra de fluido cérebro espinal (SHARMA et al, 1993; SINGHAL et al, 2001). Métodos de cultivo também podem ser utilizados no diagnóstico. Amostras biológicas como fluido cérebro espinal e tecido cerebral, podem ser inoculadas em meio de crescimento para ameba (MARTINEZ e VISVESVARA, 1991). Ressonância magnética e tomografia computadorizada apesar de não fornecerem diagnóstico definitivo, são realizadas em alguns pacientes e ajudam a localizar e reconhecer as lesões características (MARTINEZ e VISVESVARA, 1997).

As **lesões cutâneas** são caracterizadas pela presença de pápulas nodulares purulentas que se desenvolvem em nódulos eritematosos e ulcerações endurecidas na pele. É mais frequente em pacientes infectados por HIV. Ainda não há consenso se a

forma cutânea é o foco primário da infecção ou o resultado da disseminação hematogênica (FRIEDLAND et al, 1992; TORNØ et al, 2000)

Como diagnóstico das formas cutâneas, pode ser utilizado o cultivo de amostras de lesões em meios utilizados para o crescimento de amebas. Biópsia e exame histológico mostram um foco de necrose rodeado por células inflamatórias, vasculite, cistos e trofozoítos. Análises moleculares, de RFLP e testes imunocitoquímicos também podem ser realizados (FRIEDLAND et al, 1992; GORDON et al, 1992; SINGHAL et al, 2001).

2.2.3.2 Ceratite amebiana

Além de infecções sistêmicas, *Acanthamoeba* spp causa a **Ceratite Amebiana**, doença aguda, dolorosa e progressiva de acometimento da córnea. Tipicamente, somente um olho é envolvido (ERTABAKLAR et al, 2009; SARPARANTA et al, 2009), mas casos de ceratite amebiana bilateral por *Acanthamoeba* são descritos na literatura (KIM e KIM, 2009; LEE e GOTAY, 2010). Acomete principalmente indivíduos imunocompetentes, mas que não desenvolvem imunidade protetora à reinfecção (NIEDERKORN et al, 1999). Esta doença ocorre com mais frequência em usuários de lentes de contato uma vez que as lentes podem atuar como veículos carreadores do patógeno. Trauma de córnea por agentes físicos que possam veicular e introduzir a ameba no tecido ocular, também pode ocasionar a infecção (JONES et al, 1975; STAPLETON et al, 2009).

Para os usuários de lente de contato, o uso de soluções salinas caseiras na limpeza, higiene e manutenção das lentes, utilizando água da torneira representa a maior fonte de infecção, pois podem conter o agente etiológico. A falta de cuidados higiênicos durante a limpeza e armazenamento das lentes e seus estojos produz um biofilme bacteriano, que pode servir de alimentação para amebas. A lesão ocular causada por amebas juntamente com bactérias, pode ser maior devido à liberação de secreções e metabólitos (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; VISVESVARA et al, 2007).

Outro fator de risco é o uso de lentes de contato durante atividades recreativas em piscinas ou fontes naturais de água que possam albergar microbiota bacteriana e amebas patogênicas (SINGHAL et al, 2001).

A maioria das espécies de *Acanthamoeba* causadoras de ceratite estão agrupadas no genótipo do tipo 4, estabelecido por Stothard et al (1998). As espécies capazes de causar ceratite amebiana relatadas até o momento são *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A.*

hatchetti, *A. culbertsoni*, *A. rhysodes*, *A. griffinii*, *A. quina* e *A. lugdunensis* (SCHAUMBERG et al, 1998, VISVESVARA et al, 2007).

Olhos avermelhados, lacrimejamento, fotofobia, dor e edema de pálpebra são os principais sintomas da doença. Mas hiperemia conjuntival e inflamação na córnea também podem ocorrer. Quando trofozoítos infiltram os nervos da córnea podem causar neurite e necrose. Coriorretinite ocorre raramente quando o parasita invade a retina. No início da patogênese as amebas ficam restritas ao epitélio da córnea, mas progridem e invadem o estroma, onde causam grande estrago e provocam inflamação. O achado clínico mais característico é a presença de um infiltrado inflamatório estromal em forma de anel, constituído principalmente por neutrófilos (**Figura 1**) (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; VISVESVARA et al, 2007; ERTABAKLAR et al, 2009).

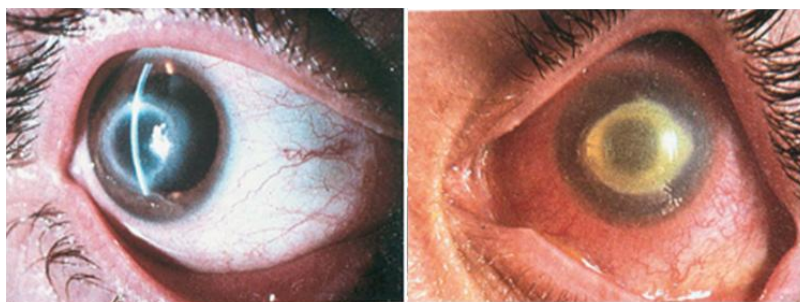


Figura 8: Olhos avermelhados, lacrimejamento, inflamação da córnea, infiltrado inflamatório estromal em forma de anel em casos de ceratite por *Acanthamoeba* (Fonte: VISVESVARA et al, 2007).

O prognóstico pode ser melhor quando o diagnóstico é precoce e o tratamento iniciado imediatamente. No entanto, isso nem sempre ocorre, pois os sinais e sintomas clínicos podem ser confundidos com outras formas de ceratite, como fúngica ou viral. Este diagnóstico equivocado pode complicar o quadro clínico do paciente, pois será estabelecido um tratamento inadequado com o uso de agentes antimicrobianos, antivirais, antifúngicos ou corticóides que, apesar de produzir uma melhora inicial, podem mascarar o quadro clínico e contribuir para a progressão da doença (EY et al, 2008; SHI et al, 2009). Em 2004, o número aproximado de casos de ceratite amebiana constatado no mundo chegou a superar 3000 (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004).

O diagnóstico clínico pode ser feito baseado na constatação de lesões epiteliais, infiltrado estromal, ceratoneurite radial associados a sintomas como dor intensa e fotofobia (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; TRNKOVÁ et al, 2009).

Raspado de córnea e material de biópsia podem ser utilizados para cultura e identificação do agente etiológico, (KILVINGTON et al, 1990; SCHAUMBERG et al, 1998). PCR tem tido uma baixa utilização, apesar de sua eficácia como ferramenta diagnóstica capaz de detectar DNA de *Acanthamoeba* em amostras da córnea e inclusive em lágrimas contendo um máximo de cinco amebas (KIM et al, 1996; KONG e CHUNG, 1996; KHAN et al, 2001).

O desenvolvimento da ceratite amebiana não ocorre somente pelo simples contato com *Acanthamoeba*, é preciso mais do que isso, pois sua prevalência é frequente em usuários de lentes de contato assintomáticos, segundo relatos de estudos onde verificou-se que aproximadamente 50% dos indivíduos saudáveis possuem anticorpos contra *Acanthamoeba* (LARKIN et al, 1990; TANAKA et al, 1994). Isso levanta a hipótese de que outros fatores possam estar envolvidos na patogênese desta doença e que o sistema imune do paciente pode exercer um papel fundamental na predisposição a doença. A carga parasitária infectante, por exemplo, pode contribuir para o estabelecimento ou não da infecção. Deve-se levar em consideração, também, que cepas de ameba podem variar quanto a sua patogenicidade.

Mas a presença de Amebas de Vida Livre não patogênicas ou de baixo potencial patogênico em lentes de contato, é um fato que não deve ser desconsiderado, pois elas podem albergar bactérias e agir como seus veículos. *Pseudomonas aeruginosa*, um dos principais patógenos oculares, pode sobreviver e já foi isolada dos cistos de *Acanthamoeba* (WALOCHNIK et al, 1999).

Outras amebas como *Valkampfia*, *Naegleria* e *Hartmannella* (KENNEDY et al, 1995; AITKEN et al, 1996) também são capazes de causar ceratite ou pelo menos estar associada a ela. Porém, existem poucos relatos de casos de ceratite amebiana por estas espécies.

2.3 Ciclo de vida e morfologia de *Acanthamoeba*

O ciclo de vida da *Acanthamoeba* compreende dois estádios em condições ambientais: o trofozoíto e o cisto. No entanto, ambas as formas são reconhecidas por sua ampla tolerância a uma grande variedade de ambientes. O trofozoíto é a forma de locomoção e de alimentação ativa da ameba, a reprodução destes organismos ocorre por divisão binária. Alimenta-se de bactérias, algas e leveduras do ambiente, principalmente do solo e da água, mas também consegue capturar nutrientes por pinocitose. A ameba na forma de cisto possui a vantagem de sobreviver e resistir às condições ambientais mais

adversas como dissecação, inanição e agentes físicos e químicos como produtos de higiene e limpeza, antimicrobianos, aquecimento, refrigeração e radiação ultravioleta (AKSOZEC et al, 2002). Estudos indicam que nesta forma podem sobreviver *in vitro* por até 20 anos ou mais (MAZUR et al, 1995).

O trofozoíto varia em tamanho de 25 a 40 μm , possui uma membrana plasmática trilaminar e é caracterizado pela presença de projeções superficiais na forma de espinhos denominadas acantópodes, um vacúolo contrátil proeminente no citoplasma para controlar o conteúdo intracelular de água, e um núcleo com um grande nucléolo central (**Figura 2 a**) (PAGE, 1967; BOWERS e KORN, 1979).

Os cistos variam em tamanho de 10 a 20 μm , possuem parede dupla (endo e ectocisto) composta por celulose e dotada de poros para possibilitar a liberação do trofozoíto da ameba, que geralmente ocorre em condições ambientais desejáveis, em um processo denominado desencistamento (**Figura 2 b**). Morfologicamente, pela característica cística, *Acanthamoeba* spp encontra-se dividida em três grupos distintos: Grupo I, grupo II e grupo III (PAGE, 1967; PUSSARD e PONS, 1977). O Grupo I possui um cisto maior, medindo 18 μm ou mais, com endocisto em forma de estrela e ectocisto arredondado que pode ser liso ou rugoso. O grupo II compreende cistos menores que 18 μm com endocisto poliédrico, triangular, globular ou ovóide e ectocisto ondulado. Já no grupo III os cistos apresentam-se com tamanho menor que 19 μm , o endocisto é globular ou ovóide e o ectocisto fino e liso.

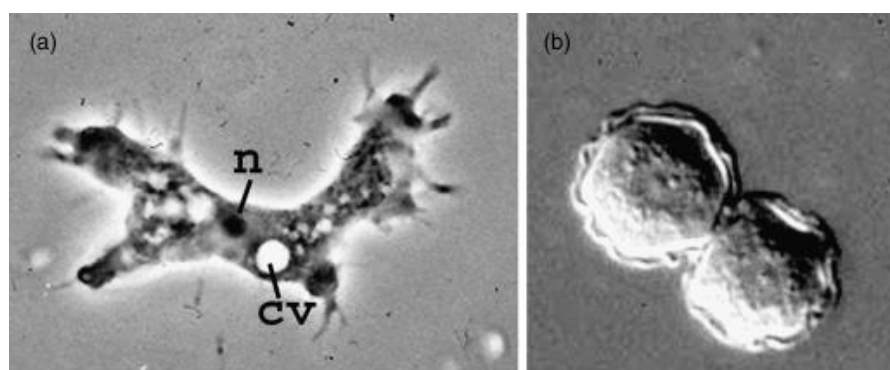


Figura 9: *Acanthamoeba castellanii*, trofozoíto (a), cisto (b). n: núcleo; cv: vacúolo contrátil (Fonte: VISVESVARA et al, 2007).

A organização celular da *Acanthamoeba* já foi estudada por microscopia eletrônica e organelas como complexo de Golgi, retículo endoplasmático liso e rugoso,

ribossomos livres, vacúolos digestivos, mitocôndria e microtúbulos são encontradas nestas amebas (BOWERS e KORN, 1969; VISVESVARA et al, 2007).

2.4 Classificação morfológica e genotípica de *Acanthamoeba*

Segundo a classificação sistemática clássica descrita por Levine et al (1980), o gênero *Acanthamoeba* pertence ao Reino *Protozoa*, filo *Sarcomastigophora*, classe *Rhizopoda*, ordem *Amoebida* e família *Hartmannellidae*. Apesar de a proposta tradicional de Levine e seus colaboradores (1980) continuar vigorando nos tempos atuais, uma nova classificação dos protozoários foi proposta pela Sociedade Internacional de Protozoologia em 2005 (ADL et al, 2005). De acordo esta classificação, *Acanthamoeba* encontra-se no super grupo *Amoebozoa* e na primeira classificação *Acanthamoebidae*. A proposta se baseia em ferramentas mais modernas além da análise morfológica, como análises bioquímicas e moleculares.

Pela análise morfológica de trofozoítos e cistos de amebas em microscópio óptico comum, já é possível realizar a identificação do gênero *Acanthamoeba*, uma vez que ambas as formas evolutivas da ameba apresentam características morfológicas típicas deste gênero (PAGE, 1967; BOWERS e KORN, 1979).

Mas uma técnica de PCR, descrita por Khan e Paget (2002), tem sido utilizada também como uma alternativa para a identificação do gênero destas amebas, ou ainda para confirmar este gênero quando a identificação foi realizada pela análise morfológica. Esta confirmação tem sua importância uma vez que existem outras Amebas de Vida Livre que são morfologicamente similares a *Acanthamoeba*. Esta PCR é realizada utilizando um par de *primers* que amplificam uma região dentro do gene 18S rDNA de *Acanthamoeba*, originados a partir do sequenciamento gênico de uma região de alta variabilidade de *Acanthamoeba castellanii*, realizado por Gunderson e Sogin (1986). A sequência amplificada é uma região bastante conservada em *Acanthamoeba*, que pode variar de 900 a 1100 pb e, capaz de discriminar com especificidade este gênero (KONG e CHUNG, 1996; KHAN e PAGET, 2002; COSTA et al, 2009).

Pelos estudos taxonômicos realizados até o momento, verifica-se a existência de 24 espécies de *Acanthamoeba*, as quais foram descritas de acordo com suas características morfológicas (VISVESVARA et al, 2007). A identificação específica baseada na morfologia cística é pioneira nos estudos taxonômicos de *Acanthamoeba*, mas sabe-se que ela pode variar de acordo com as condições de cultivo, o que torna esta forma de identificação duvidosa e passível de discussão. Atualmente, a morfologia dos

cistos é utilizada na classificação dos isolados em grupos morfológicos (**Tabela 1**), (PUSSARD e PONS, 1977; PAGE, 1988; KHAN et al, 2001).

Tabela 3: Classificação das principais espécies de *Acanthamoeba* de acordo com os grupos morfológicos descritos por Pussard e Pons (1977) *

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
<i>A. Astronyxis</i>	<i>A. Castellani</i>	<i>A. Palestinensis</i>
<i>A. comandoni</i>	<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. lenticulata</i>
	<i>A. lugdunesis</i>	<i>A. pustulosa</i>
	<i>A. quina</i>	<i>A. royreba</i>
	<i>A. rhisodes</i>	
	<i>A. divionensis</i>	
	<i>A. paradiivionensis</i>	
	<i>A. griffini</i>	
	<i>A. triangularis</i>	

* Adaptado de Nwachuku e Gerba, 2004

Durante as últimas décadas, a taxonomia do gênero *Acanthamoeba* foi revisada e muitos métodos não morfológicos aplicados para a tentativa de classificação (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; VISVESVARA et al, 2007).

Primeiramente, métodos imunológicos e bioquímicos, como análise do perfil de proteínas antigênicas por técnicas de *Western Blot* ou imunofluorescência, e análise do perfil de isoenzimas por eletroforese, foram empregadas na tentativa da identificação específica, mas não tiveram sucesso na obtenção de uma conclusão. Além disso, a análise por perfil de isoenzimas, por exemplo, apresenta limitações que incluem a necessidade de um grande número de parasitas em crescimento axênico, o que é bastante trabalhoso e exige longa disponibilidade de tempo (DE JONKHEERE, 1983; COSTAS e GRIFFITHS, 1984, 1986). Posteriormente, técnicas moleculares como RFLP (*Restriction Fragment length polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) foram utilizadas para estes estudos, mas revelaram que a identificação específica de *Acanthamoeba* apresenta dificuldade devido ao alto polimorfismo observado entre isolados individuais (KONG et al, 1995; KIM et al, 1996; ALVES et al, 2000).

Atualmente, o sequenciamento gênico tem sido a metodologia mais aplicada no estudo taxonômico de *Acanthamoeba* e tem se mostrado útil principalmente na caracterização dos isolados em genótipos ou tipos sequenciais (RIVERA e ADAO et al, 2009; VISVESVARA et al, 2010). Baseado na variabilidade entre as sequências do gene completo 18S rDNA, Stothard et al (1998) classificaram 53 isolados de espécies de *Acanthamoeba* designando 12 tipos sequenciais, de T1 a T12. Posteriormente, mais 3 grupos foram reconhecidos: T13 (HORN et al, 1999); T14 (GAST, 2001) e T15 (HEWETT et al, 2003). Considera-se ainda que muitos outros tipos sequenciais possam existir.

A classificação mais aceita, até o momento, integra os grupos morfológicos que foram estabelecidos por Pussard e Pons (1977) juntamente com os 12 tipos de sequências (STOTHARD et al, 1998) (**Tabela 2**). O grupo T4 compreende a maioria das cepas causadoras de ceratite amebiana (STOTHARD et al, 1998; WALOCHNIK et al, 2000; SCHROEDER et al, 2001).

Tabela 4: Integração entre grupos morfológicos (PUSSARD e PONS, 1977) e genótipos (STOTHARD et al, 1998), utilizados em estudos de caracterização genotípica de *Acanthamoeba*.

FENÓTIPO	GENÓTIPO
I	T7, T8, T9
II	T3, T4, T11
III	T1, T2, T5, T6, T10, T12

Além do gene completo 18S rDNA, outros fragmentos foram utilizados em estudos taxonômicos de *Acanthamoeba*, como por exemplo, o fragmento ASA.S1 (*Acanthamoeba specific amplimer S1*) do gene 18S rDNA (SCHROEDER et al, 2001), pequenas subunidades ribossomais nucleares e mitocondriais (genes SSU rRNA) (VISVESVARA, 1991; GAST et al, 1996; LEDEE et al, 2003), o genoma 16S rRNA mitocondrial completo (CHUNG et al, 1996; YU et al, 1999) ou mesmo o genoma mitocondrial completo (KILVINGTON et al, 1991; KONG et al, 1995; CHUNG et al, 1996) e ainda a análise do DNA genômico total por RAPD (ALVES et al, 2000).

Estudos utilizando sequências ITS1, que está localizada entre os genes 18S rRNA e o 5,8S rRNA também foram desenvolvidos (KÖSHLER et al, 2006). É uma região de alta variabilidade e utilizada como marcador na discriminação de espécies que estão muito proximamente relacionadas e apresentam-se morfologicamente indistinguíveis (BALDWIN et al, 1995; SLAPETA et al, 2003). No entanto, o uso desta sequência em pesquisa com *Acanthamoeba* é pouco descrito na literatura. Segundo Köshler et al (2006), os resultados não corroboram com a classificação estabelecida até o momento por outras técnicas, como as morfológicas e as baseadas na sequência 18S rDNA.

Mesmo diante da possibilidade de utilização de outras regiões gênicas, o sequenciamento parcial do gene 18S rDNA, utilizando o fragmento ASA.S1, é a abordagem mais amplamente empregada, servindo de parâmetro para identificação genotípica de amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba* em todo o mundo (WALOCHNIK et al, 2000; SCHROEDER et al, 2001; XUAN et al, 2008; VISVESVARA et al, 2010; ZHAO et al, 2010).

Apesar de os mais variados estudos terem sido feitos em prol da determinação de uma taxonomia convincente, até o momento a classificação destas amebas encontra-se passível de mudanças (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; VISVESVARA et al, 2007).

2.5 Potencial patogênico de *Acanthamoeba*

Várias espécies de *Acanthamoeba* são capazes de causar ceratite. Ainda muito se questiona sobre o que tem levado estes organismos a desenvolver infecções, se seriam fatores ambientais como oportunidade e condições apropriadas para se desenvolver a infecção (SCHUSTER, 2002) ou características distintas e capacidade intrínseca de cada cepa (MAZUR et al, 1995; WALOCHNIK et al, 2000).

A classificação genotípica ou a determinação da espécie de um isolado não fornece indicação quanto a sua patogenicidade, pois aqueles patogênicos e não patogênicos podem ser classificados dentro do mesmo fenótipo, genótipo ou ainda dentro da mesma espécie.

Assim, alguns estudos foram realizados com o objetivo de acessar o potencial patogênico de isolados de *Acanthamoeba*. Testes utilizando animais de laboratório como modelo de Encefalite Amebiana Granulomatosa, auxiliam a obter informações sobre o curso da doença, patogenicidade em espécies de *Acanthamoeba* e até mesmo a

diminuição da patogenicidade devido a um cultivo muito prolongado (MAZUR et al, 1995). Camundongos inoculados com suspensões de *Acanthamoeba* desenvolvem sinais clínicos bastante semelhantes aos humanos (CULBERTSON et al, 1958) e há modelos experimentais também para a ceratite amebiana (VAN KLINK et al, 1993).

No entanto, dada as dificuldades em se trabalhar com animais experimentais, tanto no aspecto econômico quanto ético, outros testes de realização mais fácil e menor custo têm sido desenvolvidos. Além disto, um único critério muitas vezes não é suficiente para classificar um isolado como patogênico.

Visando avaliar a capacidade de crescimento destes organismos em diferentes temperaturas, foi desenvolvido o teste de termotolerância. A tolerância à temperatura em torno de 37 °C indica que a ameba poderia se desenvolver em temperatura corporal humana. A temperatura de 34 °C também deve ser considerada nos testes, pois refere-se à temperatura da córnea humana. Temperaturas superiores a 37 °C até 42 °C também são utilizadas para acessar o potencial patogênico de *Acanthamoeba*, pois verificam a capacidade dos isolados em resistir temperaturas próximas a da febre humana (GRIFFIN, 1972; WALOCHNIK et al, 2000; 2001; KHAN et al, 2001).

A sobrevivência em cultivo axênico, assim como a taxa de crescimento dos parasitos também é relacionada diretamente à patogenicidade dos mesmos (DE JONCKHEERE, 1980; WALOCHNIK et al, 2000; KHAN et al, 2001).

Outro teste utilizado é o de análise do efeito citopático dos isolados utilizando-se vários tipos de células. Os resultados obtidos até o momento mostram que somente cepas patogênicas possuem efeito citopático nestas células (WALOCHNIK et al, 2000; KHAN et al, 2001; LORENZO-MORALES et al, 2007).

Devido à complexidade dos testes que utilizam células de cultura, Khan et al (2001) propuseram o ensaio de osmotolerância, para ser utilizado em detrimento dos testes de efeito citopático. Segundo estes autores, somente os isolados denominados “patogênicos” apresentaram capacidade de sobreviver em meio de alta osmolaridade.

Outros testes usados para acessar o potencial patogênico de *Acanthamoeba* incluem a atividade de proteases usando ensaios colorimétricos (KHAN et al, 2000), capacidade de adesão e velocidade de encistamento/desencistamento (DA ROCHA-AZEVEDO e COSTA e SILVA-FILHO, 2007).

A patogenicidade de *Acanthamoeba* tem sido mencionada como uma característica intrínseca de cada cepa. Devido à ubiquidade deste parasita na natureza, isolados não patogênicos podem estar presente no olho não causando infecção. Por este

motivo os isolados clínicos devem ser detectados e diferenciados quanto ao seu potencial patogênico. Por meio de certas características reveladas pelos testes fisiológicos, seria teoricamente possível diferenciar isolados patogênicos e não patogênicos de *Acanthamoeba*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral: Caracterizar amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba* obtidas da cidade de Vitória-ES, por critérios morfológicos, moleculares e fisiológicos.

3.2 Objetivos Específicos:

- Identificar os isolados de *Acanthamoeba* obtidos de lesões de ceratite amebiana e de poeira residencial por análise morfológica e por PCR.
- Realizar a identificação genotípica dos isolados por sequenciamento parcial do gene 18S rDNA.
- Avaliar os critérios fisiológicos de termotolerância e de osmotolerância como indicadores de potencial patogênico dos isolados.
- Comparar o comportamento dos isolados de cultura clonada em meio PYG (sistema axênico) com o cultivo em ágar soja com bactérias, pelos ensaios fisiológicos de termotolerância e de osmotolerância.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Identificação dos isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba*

4.1.1 Amostras

Oito isolados utilizados neste trabalho foram obtidos e gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Cinthia Furst Leroy Gomes da Universidade Federal do Espírito Santo. Quatro isolados são de raspado de córnea de pacientes com ceratite (com suspeita de ceratite amebiana por *Acanthamoeba*) e quatro foram obtidos da poeira da residência de um destes pacientes (**Tabela 3**).

Outras quatro culturas de *Acanthamoeba* foram incluídas, para fins de comparação nos ensaios fisiológicos e de sequenciamento parcial do gene 18S rDNA. Duas delas foram obtidas de poeira hospitalar do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (COSTA et al, 2009) e as outras duas foram cedidas pelo pesquisador Dr. Fernando Costa e Silva-Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, referente às cepas do *American Type Culture Collection* ATCC # 30461 (isolado clínico de lesão de

ceratite amebiana) e ATCC # 30872 (isolado ambiental obtido de água fresca), aqui denominados AP2 e AP4, respectivamente (**Tabela 3**).

Tabela 3: Isolados de *Acanthamoeba* obtidos de raspado de córnea e de poeira de diferentes ambientes.

ISOLADO	ORIGEM	DATA DE ISOLAMENTO	HISTÓRICO
WAL	Clínica, Vitória, ES	01/2007	CA* associada ao uso de lente de contato, raspado de córnea humana
ALX	Clínica Vitória, ES	10/2006	CA* associada ao uso de lente de contato, raspado de córnea humana
LG	Clínica Vitória, ES	02/2008	CA* associada ao uso de lente de contato, raspado de córnea humana
AR	Clínica Vitória, ES	05/2007	CA* associada ao uso de lente de contato, raspado de córnea humana
AR11	Ambiental Vitória, ES	07/2007	Poeira - grade posterior da geladeira, na cozinha da residência do paciente do qual se obteve o isolado AR
AR12	Ambiental Vitória, ES	07/2007	Poeira - cômoda de suporte para televisão, na sala de estar do paciente do qual se obteve o isolado AR.
AR14	Ambiental Vitória, ES	07/2007	Poeira - Cômoda localizada ao lado da cama, local onde o paciente do qual se obteve o isolado AR guardava suas lentes.
AR15	Ambiental Vitória, ES	07/2007	Poeira - Janela da sala de estar, próximo ao sofá onde a paciente da qual foi isolado a amostra AR manipulava com frequência as suas lentes.
OPH	Ambiental Curitiba, PR	02/2007	Poeira – Setor de Oftamologia Hospital das Clínicas – UFPR
ICU	Ambiental Curitiba, PR	02/2007	Poeira – Unidade de Tratamento Intensivo – Hospital das Clínicas – UFPR
AP2	ATCC30461	1973	CA* associada ao uso de lente de contato, raspado de córnea humana
AP4	ATCC30872	1965	Ambiental – água fresca

* CA = Ceratite amebiana

4.1.2 Cultivo dos isolados em sistema polixênico (meio ágar soja)

As amostras foram inicialmente cultivadas em meio sólido ágar soja (ANEXO 1) juntamente com bactérias *Escherichia coli*, em placas de Petri (90 x 15 mm), conforme descrito por Foronda (1979).

4.1.3 Identificação dos isolados por critérios morfológicos

Critérios estabelecidos por Pussard e Pons (1977) e Page (1988), como a medida do tamanho dos cistos, formato e características de endocisto e ectocisto, foram utilizados para estabelecer a classificação dos isolados originais de *Acanthamoeba*, em culturas clonadas, nos grupos morfológicos clássicos I, II e III. Culturas mantidas em ágar-soja com bactérias, cultivadas por 72 horas, quando então a maioria das formas observadas eram cistos, foram utilizadas para a avaliação. Os cistos foram recolhidos, lavados por centrifugação (400 x g, 5 minutos) em 10 mL de água destilada esterilizada e colocados entre lâmina e lamínula. A medida do diâmetro foi realizada usando uma ocular milimetrada em microscópio óptico comum, em aumento de 400x.

4.1.4 Confirmação do gênero pela PCR (KHAN e PAGET, 2002)

Extração de DNA: Trofozoítos da cultura original mantidos em meio ágar soja foram utilizados para obtenção de DNA por meio da técnica clássica de extração por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) (SAMBROOK et al, 1989). Os trofozoítos foram lavados por centrifugação em água destilada esterilizada e o sedimento foi ressuspensão em tampão de lise (Tris 10mM pH 8.0, EDTA 10mM, NaCl 400mM, Triton X-100 a 2%), com 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e proteinase K (1µg/µL), na proporção aproximada de 500 µL de tampão de lise a cada 10⁶ células. Após homogeneização suave e incubação por 2 horas à temperatura de 55 °C, foram realizadas duas extrações consecutivas com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e depois com clorofórmio álcool isoamílico (24:1), com centrifugação a 1500 x g por 5 minutos. O DNA foi precipitado com etanol 96% e após centrifugação a 5000 x g durante 10 minutos, o material foi lavado uma vez com etanol a 70%, seco à temperatura ambiente *overnight* e re-hidratado em 50 a 100 µL de água ultra-pura esterilizada. As concentrações de DNA foram determinadas em espectrofotômetro Shimadzu UV-160 a 260 nm e a qualidade do DNA visualizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

PCR: A PCR utilizou os iniciadores que amplificam uma região conservada do gene 18S rDNA em amostras de *Acanthamoeba*, os quais possuem as seguintes sequências nucleotídicas: *Primer Forward:* 5'- TTTGAATTCGCTCCAA TAGCGTATATTAA-3', e *Primer Reverse:* 5'- TTTGAATTCAGAAAGAGCTATCA ATCTGT-3' (KHAN e PAGET, 2002). As reações foram realizadas em volume de 25 µL, contendo 4mM de MgCl₂, 200µM de dNTP, 0,2 U de *Taq polimerase* (Invitrogen®), 0,5µM dos *primers* e 50 ng de DNA molde. As condições da reação foram de desnaturação inicial à temperatura de 94 °C, durante 4 minutos; 30 ciclos de desnaturação à temperatura de 94 °C, por 1 minuto, anelamento à temperatura de 60 °C por 1 minuto, extensão à temperatura de 72 °C, durante 2 minutos e extensão final uma temperatura de 72 °C, durante 10 minutos, em termociclador *Biocycler*, modelo MJ96 (Biosystems®). Os produtos, de tamanho esperado em torno de 900 a 1100 pb, foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo.

4.2 Clonagem e axenização dos isolados

4.2.1 Clonagem das amebas em meio de cultivo ágar soja

A clonagem visou a obtenção de uma célula que daria origem a populações homogêneas a partir da cultura obtida de material de raspado de córnea ou do ambiente, para avaliação pelos testes fisiológicos e utilização no sequenciamento gênico. Uma técnica de diluição foi empregada e para isto utilizou-se trofozoítos em água destilada esterilizada e quantificados em câmara de Neubauer. A partir desta contagem, a concentração foi ajustada para 200 trofozoítos/mL (estimativa de 1 trofozoíto a cada 5 µL) e esta suspensão foi distribuída, em volumes de 1,5 a 5 µL, em campos da placa de meio ágar soja novo, delimitados externamente com caneta. Após 24 a 48 horas os campos foram examinados em microscópio invertido para seleção daqueles onde foram constatados trofozoítos. Detectada a presença de clones no campo, foram transferidos à outra placa, com auxílio de pipeta e pinça esterilizadas. Os clones foram escolhidos ao acaso e cada um deles foi clonado mais duas vezes sucessivas, constituindo clones de terceira geração (OROZCO et al, 1985).

4.2.2 Axenização dos isolados e cultivo em meio PYG

As amostras clonadas foram cultivadas em sistema axênico para posterior análise molecular da sequência parcial do gene 18S rDNA e comparar a taxa de crescimento das culturas em diferentes condições de cultivo (em ágar soja com bactérias e em cultura axênica). Os cistos, predominantes em culturas com mais de 72 horas, foram semeados em meio axênico. Os cistos foram recuperados da placa contendo meio ágar soja por lavagem com 5 mL de água destilada esterilizada e transferidos a tubos de cultura. O sedimento contendo os cistos foi lavado 3 vezes por centrifugação a 450 x g em água destilada esterilizada e suspensos em 1 mL de água destilada, acrescentando-se enrofloxacino (Baytril®) a uma concentração final de 625µg/mL. Esta solução contendo os cistos foi mantida *overnight* a 4 °C e depois os cistos foram lavados novamente por centrifugação, sendo então transferidos a tubos de cultura (120 x 11 mm) com 5 mL de meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal (ROWBOTHAM,1980) e contendo o antibiótico enrofloxacino (Baytril®) na concentração de 5µg/mL (ANEXO 2). Os tubos foram incubados à temperatura de 28 °C em estufa microbiológica (Fanem® modelo 5501) em posição inclinada. O crescimento de trofozoítos foi avaliado por microscópio óptico invertido a partir do quinto dia após o repique.

4.3 Sequenciamento parcial do gene 18S rDNA

4.3.1 PCR

A reação de amplificação do fragmento do gene 18S rDNA de quase todos os isolados foi realizada utilizando como molde DNA de trofozoítos de culturas clonadas mantidas em meio PYG, em sistema axênico. Como um dos isolados, AR12, não cresceu neste sistema de cultivo, utilizou-se, neste caso, para a reação de amplificação, DNA extraído de trofozoítos clonados em cultivo em ágar soja, no sistema polixênico. A reação foi realizada utilizando os iniciadores JDP1 (5' GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA) e JDP2 (5'TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA), que amplificam um fragmento de aproximadamente 450 pares de base denominado ASA.S1 (*Acanthamoeba specific amplimer S1*), conforme Schroeder et al, (2001). O volume da reação foi de 25 µL, contendo 4mM de MgCl₂, 200µM de dNTP, 0,2 U de *Taq polimerase* (Invitrogen®), 0,5 µM dos *primers* e 30 ng de DNA molde. As condições da reação foram de desnaturação inicial à temperatura de 94 °C, durante 7

minutos; 25 ciclos de desnaturação à temperatura de 94 °C, por 1 minuto; anelamento à temperatura de 60 °C por 1 minuto; extensão à temperatura de 72 °C por 2 minutos e extensão final à temperatura de 72 °C durante 10 minutos, em termociclador *Biocycler*, modelo MJ96 (Biosystems®). O produto da PCR foi visualizado em luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.3.2 Purificação do produto de PCR

O produto de PCR foi purificado segundo o protocolo do kit de purificação *PureLink* (Invitrogen®). Foi adicionado 200µL de tampão de purificação *Purilink binding buffer* ao tubo contendo o produto da PCR. A solução foi homogeneizada e transferida para a coluna de purificação, centrifugada a 5000 x g por 1 minuto e o conteúdo do filtrado descartado. No centro da coluna foi adicionado então 650 µL do tampão de lavagem *Purilink wash buffer* e centrifugado novamente a 5000 x g durante 1 minuto. Este novo filtrado foi descartado e a coluna foi centrifugada por mais 3 minutos a 5000 x g. Todo o filtrado foi descartado. A coluna foi então transferida para tubo tipo *ependorf* com capacidade para 1,5 mL, onde foi adicionado 13 µL do tampão de separação de DNA *Purilink Elution Buffer* (Invitrogen®). Após um minuto de incubação à temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada por 2 minutos a 5000 x g. O volume separado foi coletado e depositado novamente no centro da coluna. Após 2 minutos de centrifugação a 5000 x g, o volume eluído foi quantificado em espectrofotômetro *Shimadzu* UV-160 a 260 nm e 3 µL foram aplicados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, para visualização da qualidade das bandas.

4.3.3 Reação de Sequenciamento

O sequenciamento gênico foi realizado segundo a técnica clássica descrita por Sanger et al (1977) e posteriormente modificada por Karger et al (1996). Foi utilizado o *kit Big Dye terminator* (Applied Biosystems®) em um sistema de 10 µL contendo: 0,5 µL de *Big Dye Terminator*; 0,5 µL de Tampão 2,5X (200 mM TrisHCl e 5 mM MgCl₂), 5 pmoles do iniciador universal JDP1 ou reverso JDP2 e 30 ng de DNA purificado. As condições da reação foram de desnaturação inicial à temperatura de 94 °C durante 1 minuto; 45 ciclos de desnaturação à temperatura de 94 °C por 10 segundos, anelamento à temperatura de 60 °C por 7 segundos e extensão à temperatura de 60 °C durante 3 minutos, em termociclador *Biocycler*, modelo MJ96 (Biosystems®).

Ao volume amplificado foi adicionado 60µL de isopropanol 75% e misturado em homogeneizador. Após um período de 20 minutos à temperatura ambiente, foi centrifugado a 5000 x g durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao conteúdo restante foi adicionado 190µL de etanol 65%. Após mais 20 minutos de centrifugação a 5000 x g, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o produto foi incubado em estufa a 37 °C para secagem. Estes produtos foram colocados em sequenciador automático de DNA ABI 377 (Applied Biosystems®).

4.3.4 Análise das sequências de DNA

As sequências foram analisadas e corrigidas com o programa *Staden Package* (STADEN et al, 2001) e alinhadas com a versão 1.8 do CLUSTAL-W (THOMPSON et al, 1994) e MEGA 3 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (KUMAR et al, 2004). O programa MEGA 3 foi utilizado também para a obtenção da composição nucleotídica e aminoacídica, cálculo das distâncias e posições nucleotídicas variáveis (KUMAR et al, 2004).

4.3.5 Genotipagem de *Acanthamoeba*

As sequências nucleotídicas obtidas a partir da amplificação dos isolados para o fragmento do gene 18S rDNA, foram comparadas quanto a maior porcentagem de similaridade com as sequências nucleotídicas correspondentes das espécies publicadas por Stothard et al (1998) (**Tabela 4**), dispostas no banco de dados nucleotídicos do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio do algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Para indicar as possíveis espécies dos isolados, as sequências nucleotídicas foram comparadas com as sequências das demais espécies de *Acanthamoeba* que também estão dispostas no site da NCBI, seguindo a mesma metodologia.

Tabela 4: Espécies de *Acanthamoeba* utilizadas como referência para os estudos de genotipagem (STOTHARD et al, 1998).

NÚMERO DE ACESSO AO GENBANK	ESPÉCIES DE REFERÊNCIA	FENÓTIPO ¹	GENÓTIPO ²
U07400	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	G2	T1
U07411	<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	G3	T2
AF019050	<i>Acanthamoeba pustulosa</i>	G3	T2
AF019051	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	G2	T2
U07412	<i>Acanthamoeba griffini</i>	G2	T3
S81337	<i>Acanthamoeba griffini</i>	G2	T3
AF019052	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	G2	T3
AF019053	<i>Acanthamoeba pearcei</i>	G1	T3
U07413	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	G2	T4
U07414	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	G2	T4
U07416	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	G2	T4
U07401	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	G2	T4
U07403	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	G2	T4
U07405	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	G2	T4
U07407	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	G2	T4
AF019060	<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	G2	T4
U07415	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	G2	T4
AF019061	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	G2	T4
U07402	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	G2	T4
AF019056	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	G2	T4
AF019062	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	G2	T4
AF019057	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	G3	T4
U07417	<i>Acanthamoeba royreba</i>	G2	T4
U07406	<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	G2	T4
U94738	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	G3	T5
U94730	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	G3	T5
U94732	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	G3	T5
U94733	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	G3	T5
U94731	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	G3	T5
U94735	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	G3	T5
U94737	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	G3	T5
U94736	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	G3	T5
U94740	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	G3	T5
U94739	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	G3	T5
U94734	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	G3	T5
AF019063	<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	G3	T6
AF019064	<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	G1	T7
AF019065	<i>Acanthamoeba tubiashi</i>	G1	T8
AF019066	<i>Acanthamoeba comandoni</i>	G1	T9
AF019067	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	G3	T10
AF019069	<i>Acanthamoeba stvensoni</i>	G2	T11
AF019068	<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	G2	T11
AF019070	<i>Acanthamoeba healyi</i>	G3	T12

1. Agrupamento morfológico (PUSSARD e PONS, 1977)

2. Sequências genotípicas (STOTHARD et al, 1998)

4.4 Ensaios de termotolerância e osmotolerância

4.4.1 Termotolerância

Culturas clonadas em meio de cultivo ágar soja: O ensaio de termotolerância para culturas clonadas mantidas em meio ágar soja com bactérias foi realizado de acordo com a técnica descrita por Griffin (1972). Trofozoítos de culturas em fase exponencial de crescimento foram recolhidos da placa de meio de cultivo ágar soja e contados em câmara de Neubauer. A concentração dos parasitos foi ajustada de modo a obter 4×10^4 formas/mL de água destilada esterilizada, correspondente a 1000 trofozoítos em cada 25 μ L de suspensão, volume que foi semeado em área central de uma nova placa de meio de cultivo ágar soja (1 cm de diâmetro). As placas foram incubadas em estufa, nas temperaturas de 28 °C, 37 °C, e 42 °C, em triplicata. A cada 24 horas, o crescimento foi avaliado pela medida do diâmetro atingido pela linha de expansão de trofozoítos em relação à área central. O crescimento foi expresso em centímetros, considerando-se crescimento máximo quando a linha de expansão de trofozoítos atingia 4 cm, ou seja, o crescimento atingia toda a área da placa. A partir destes dados, foi avaliada a taxa média de crescimento dos isolados, que foi estipulada pela distância percorrida pela linha de expansão (cm), dividida pelo tempo total expresso em horas.

Culturas clonadas em meio de cultivo PYG no sistema axênico: Os trofozoítos em fase exponencial de crescimento foram contados em câmara de Neubauer, tendo a sua concentração ajustada de modo a obter $2,5 \times 10^6$ trofozoítos/mL de água destilada esterilizada. Cem microlitros desta suspensão ($2,5 \times 10^5$ trofozoítos) foram inoculados em tubos contendo 2,5 mL de meio PYG com soro bovino fetal a 10% (inóculo inicial de 1×10^5 trofozoítos/mL de meio de cultivo). Os tubos foram incubados em estufa, nas temperaturas de 28 °C, 37 °C, e 42 °C, em posição inclinada, com três repetições para cada amostra. A cada 24 horas, para avaliar o crescimento ou a diminuição do número de células, realizava-se a contagem dos trofozoítos em câmara de Neubauer, sendo expressa em número de trofozoítos/mL de meio de cultivo. A partir destes dados também foi avaliada a taxa ou velocidade média de crescimento, calculada pela fórmula $(\log NT - \log N_0) / 0,301 \times T$, onde NT refere-se a densidade máxima de trofozoítos, N_0 é o número de trofozoitos do inóculo inicial e T significa o tempo em que foi atingida a densidade máxima.

4.4.2 Osmotolerância

Culturas clonadas em meio de cultivo ágar soja: Para o teste de osmotolerância, as placas de cultura contendo meio ágar soja foram preparadas com adição de 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M de manitol, conforme experimentos de Khan et al (2001). Foi feito um inóculo de 1000 trofozoítos em área central de cada placa de Petri contendo o meio de cultivo preparado. O procedimento, que foi realizado em triplicata utilizando-se a temperatura de 28 °C, e a avaliação do crescimento, foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente para a termotolerância. O crescimento dos isolados na temperatura de 28 °C em meio de cultivo ágar soja sem adição de manitol, que foi avaliado anteriormente no teste de termotolerância, foi considerado o controle para as comparações de taxas de crescimento nas diferentes osmolaridades.

Culturas clonadas em meio de cultivo PYG no sistema axênico: O teste de osmotolerância foi realizado conforme já descrito para o de termotolerância, também em triplicata, utilizando-se o mesmo inóculo em meio PYG com soro bovino fetal a 10% contendo 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M de manitol e incubação em estufa na temperatura de 28 °C. Procedimentos de contagem e cálculo da taxa ou velocidade de crescimento foram realizados como anteriormente. O crescimento dos isolados na temperatura de 28 °C em meio de cultivo PYG sem adição de manitol, que foi avaliado anteriormente no teste de termotolerância, foi considerado o controle para as comparações de taxas de crescimento nas diferentes osmolaridades.

4.4.3 Análise dos dados

Os dados dos testes de termotolerância e osmotolerância foram avaliados de forma quantitativa e qualitativa.

Na avaliação quantitativa, as médias das taxas de crescimento foram comparadas por análise de variância (ANOVA), visando determinar se uma dada temperatura ou osmolaridade foi, de modo geral, mais propícia ao desenvolvimento das culturas. Para isto, as taxas médias de todos os isolados em uma mesma condição (temperatura ou osmolaridade) foram incluídas no mesmo grupo de análise. Para determinar diferenças na taxa de crescimento de um mesmo isolado em diferentes condições, ou seja, avaliando-se individualmente o comportamento do isolado, foram empregados métodos

de comparações múltiplas, como o teste de Bonferroni para as culturas em ágar soja e o teste de Tukey para as culturas axênicas. Um nível de significância de 5% para validar as diferenças entre as médias ($p < 0,05$) foi empregado em todos os testes.

Na avaliação qualitativa, a tolerância dos isolados às diferentes temperaturas e condições de osmolaridade foi determinada por presença ou ausência de trofozoítos viáveis na cultura, durante o período de realização dos ensaios.

5 RESULTADOS

5.1 Classificação dos isolados originais de *Acanthamoeba* por análise morfológica

5.1.1 Morfologia e características de crescimento dos isolados do gênero *Acanthamoeba*

Os quatro isolados obtidos de raspado de córnea (WAL, ALX, LG e AR) e os quatro de poeira residencial (AR11, AR12, AR14 e AR15), inicialmente cultivados em meio ágar soja contendo bactérias, apresentaram como característica de crescimento a proliferação com predomínio das formas amebóides de 24 a 48 horas após cada repique. A partir de 72 horas, ocorria o processo de encistamento e as formas císticas foram predominantes (**Figura 3**). Os trofozoítos apresentaram pseudópodes do tipo acantopódios e os cistos duas membranas típicas do gênero *Acanthamoeba*.

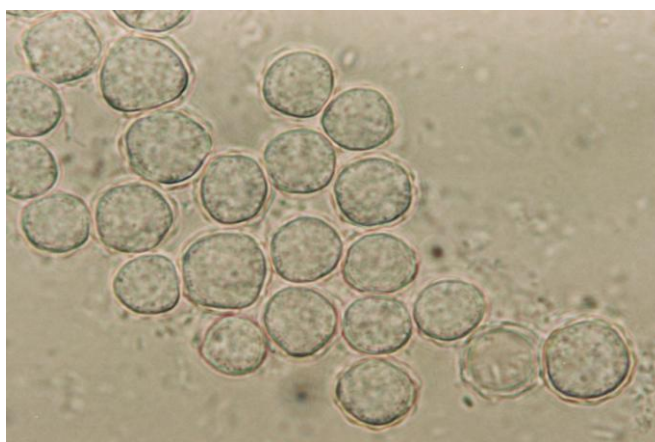


Figura 10: Fotomicrografia mostrando cistos de *Acanthamoeba* (isolado AR), após 72 horas de cultivo, em meio ágar soja com *Escherichia coli*. Aumento: 400 X.

5.1.2 Agrupamento dos isolados de *Acanthamoeba* por critérios morfológicos

A classificação nos três grupos de Pussard e Pons (1977) dos isolados, indicou que a maioria deles pertence ao grupo II. Somente o isolado ICU apresentou características do grupo I (**Tabela 5, Figura 4**).

Dentre os quatro isolados obtidos do ambiente doméstico de um dos pacientes com ceratite (AR11, AR12, AR14 e AR15), três apresentaram tamanho e morfologia de endocisto e ectocisto similares aos do isolado clínico (AR11, AR12 e AR14). Um dos isolados, AR15, apresentou uma morfologia um pouco diferenciada devido à característica do ectocisto com ondulações mais espaçadas (**Tabela 5, figura 4**).

Tabela 5: Aspectos morfológicos dos cistos e agrupamento dos isolados originais clínicos e ambientais de *Acanthamoeba*, cultivados em meio ágar soja.

ISOLADO	TAMANHO DOS CISTOS (μm) \pm DESVIO PADRÃO	FORMATO DO ENDOCISTO	FORMATO DO ECTOCISTO	AGRUPAMENTO
AR	11,5 \pm 0,96	Poliédrico	Ondulado (Ondulações curtas e menos espaçadas)	II
AR11	11,1 + 1,08	Poliédrico	Ondulado (Ondulações curtas e menos espaçadas)	II
AR12	15,1 + 1,74	Poliédrico	Ondulado (Ondulações curtas e menos espaçadas)	II
AR14	12,3 + 1,37	Poliédrico	Ondulado (Ondulações curtas e menos espaçadas)	II
AR15	11,6 + 0,82	Poliédrico	Ondulado (Ondulações longas e mais espaçadas)	II
ALX	15,7 + 1,64	Poliédrico	Ondulado (Ondulações curtas e menos espaçadas)	II
LG	12,3 + 1,10	Globular	Ondulado (Ondulações curtas e menos espaçadas)	II
WAL	11,7 + 0,99	Poliédrico	Ondulado (Ondulações curtas e menos espaçadas)	II
OPH	11,8 + 1,57	Triangular	Ondulado (Ondulações leves e espaçadas)	II
ICU	17,9+ 1,88	Estrelado	Liso (Arredondado sem ondulações)	I

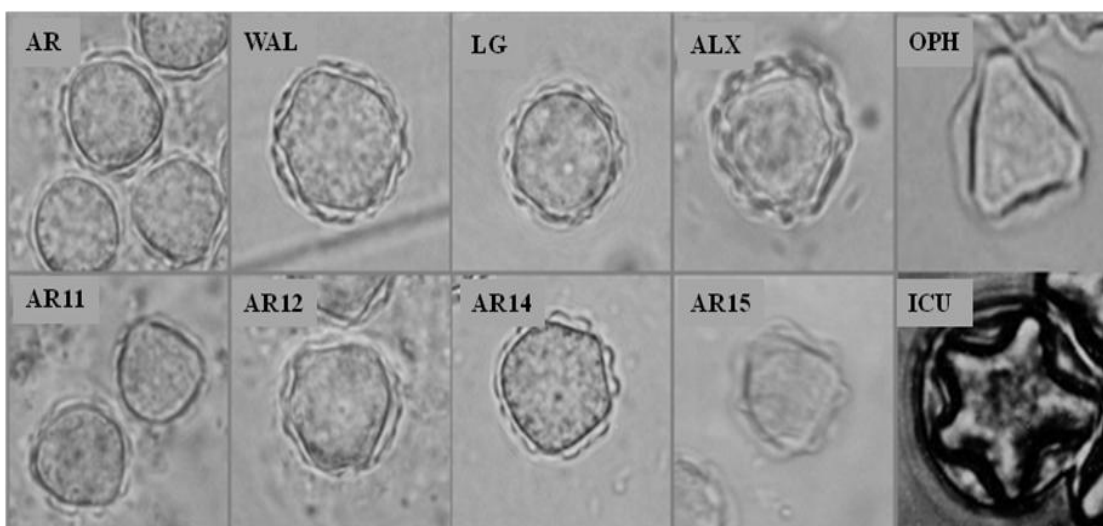


Figura 11: Fotomicrografia mostrando as diferenças morfológicas dos cistos de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* isolados em meio ágar soja com *Escherichia coli* e observados em microscópio óptico comum. AR, WAL, LG, ALX: Isolados clínicos obtidos de lesão de ceratite amebiana; AR11, AR12, AR14, AR15: Isolados ambientais obtidos de poeira doméstica; OPH e ICU: Isolados obtidos de ambiente hospitalar. Aumento: 1000 X.

5.1.3 PCR para confirmação do gênero (KHAN e PAGET, 2002)

Os oito isolados foram confirmados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* pela PCR. Todas apresentaram um fragmento de aproximadamente 1100 pb (**Figura 5**).

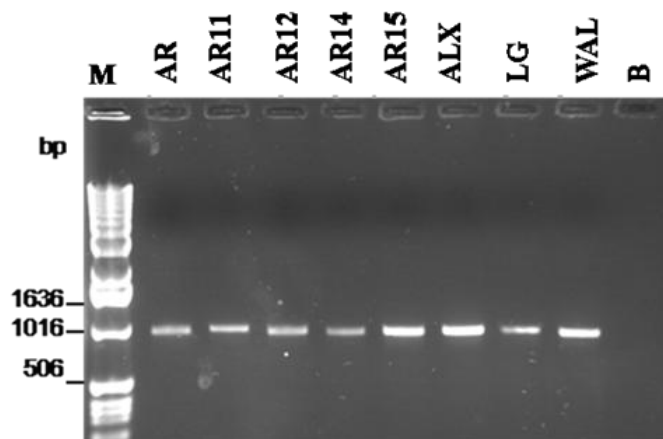


Figura 12: Produtos de amplificação por PCR de fragmento do gene parcial 18S rDNA (KHAN e PAGET, 2002) dos isolados originais clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* em cultivo em ágar soja com *Escherichia coli*. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. M: Marcador 1Kb. B: Branco. AR, WAL, LG, ALX: Isolados clínicos obtidos de lesão de ceratite amebiana; AR11, AR12, AR14, AR15: Isolados ambientais obtidos de poeira doméstica.

5.2 Clonagem e axenização das culturas

Todos os isolados estudados neste trabalho foram clonados para utilização nos testes fisiológicos e de sequenciamento gênico. Estes isolados foram mantidos no cultivo em ágar soja e também foram utilizados para o processo de axenização, permitindo assim a obtenção de culturas clonadas mantidas também em cultivo axênico.

Os cistos clonados, após a axenização, transformavam-se em trofozoítos após 24 a 72 horas de cultivo (**Figura 6**). De uma a duas semanas foi o tempo necessário para que pudessem ser realizados repiques regulares das culturas axênicas. Um único isolado clonado, AR12, não se desenvolveu em meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal.

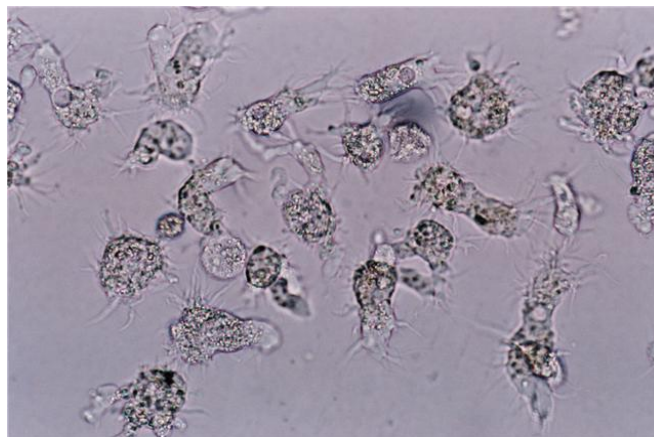


Figura 13: Fotomicrografia mostrando trofozoítos de *Acanthamoeba* (isolado OPH), em meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal, com 72 horas de cultivo. Aumento: 400 X.

5.3 Determinação de genótipos por sequenciamento parcial do gene 18S rDNA dos isolados clonados de *Acanthamoeba*

5.3.1 Dados gerais do sequenciamento

A amplificação com os *primers* JDP1 e JDP2 gerou fragmentos que variaram de 390 a 472 pares de base (**Figura 7**). As sequências nucleotídicas dos isolados analisados podem ser visualizadas nos **ANEXOS 3 e 4**.

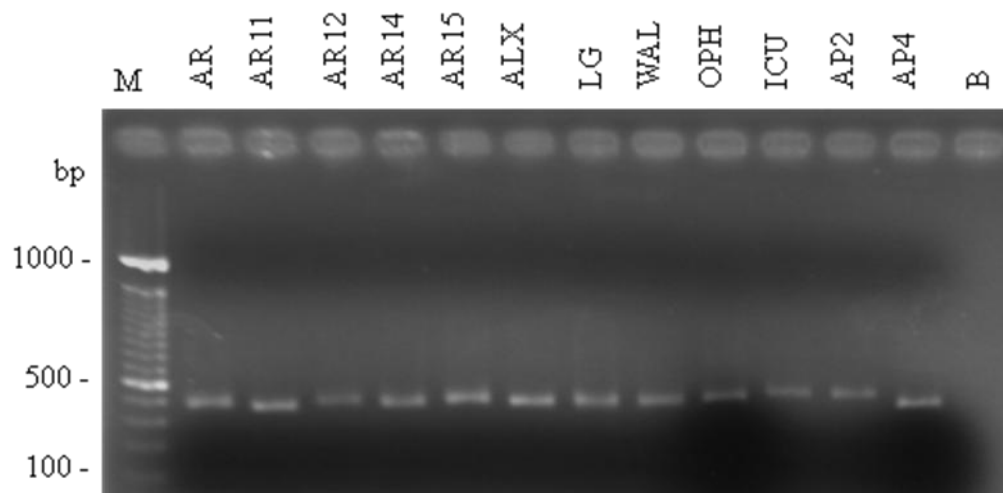


Figura 14: Produtos de amplificação por PCR do fragmento ASA. S1 do gene 18S rDNA, de amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba* em cultivo axênico. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. M: Marcador 100bp. B: Branco. AR, WAL, LG, ALX: Isolados clínicos obtidos de lesão de ceratite amebiana; AR11, AR12, AR14, AR15: Isolados ambientais obtidos de poeira doméstica; OPH e ICU: Isolados ambientais obtidos de hospital. AP2: Isolado clínico obtido de lesão de ceratite amebiana (ATCC30461); AP4: Isolado ambiental obtido de água (ATCC30872).

A maioria dos isolados foram sequenciados, com exceção dos isolados AR12 e ICU, pois apresentaram múltiplos picos para um mesmo nucleotídeo no eletroferograma, impossibilitando a determinação de suas sequências. A comparação das sequências nucleotídicas parciais do gene 18S rDNA dos isolados estudados neste trabalho, com sequências nucleotídicas desta mesma região gênica de cepas publicadas no site da NCBI, utilizando o programa BLAST, revelaram que a porcentagem de similaridade foi maior ou igual a 97% (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/04/03/2010>).

As sequências nucleotídicas obtidas a partir dos isolados AP2 e AP4 do ATCC, utilizados como controles do ensaio de sequenciamento gênico neste trabalho, apresentaram 100% de similaridade com as respectivas sequências disponíveis no banco de informações disposto no site da NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/04/03/2010>) (**Tabela 6**).

5.3.2 Classificação genotípica

Os isolados clínicos obtidos de pacientes com ceratite amebiana (AR, ALX, LG e WAL) foram classificados dentro genótipo T4, com mais de 97% de similaridade com pelo menos uma das espécies de referência usadas por Stothard et al (1998) (**Tabela 6**).

Os isolados AR11 e AR14 obtidos de poeira da residência do paciente de onde foi isolada a amostra AR foram também classificados como pertencentes ao tipo sequencial T4. O outro isolado (AR15) obtido da residência deste mesmo paciente foi classificado como pertencente ao genótipo T11, juntamente com o isolado ambiental obtido de unidade hospitalar (OPH) (**Tabela 6**).

Tabela 6: Porcentagem de similaridade obtida entre os isolados clonados de *Acanthamoeba* e as cepas de referência utilizadas na genotipagem de Stothard et al (1998).

ISOLADO	ORIGEM	GENÓTIPO (STOTHARD et al, 1998)	NÚMERO DE ACESSO AO GENBANK	% DE SIMILARIDADE
AR	Ceratite	T4	U07413	98%
AR11	Poeira doméstica	T4	U07407	99%
AR14	Poeira doméstica	T4	U07407	99%
AR15	Poeira doméstica	T11	AF019068	98%
ALX	Ceratite	T4	U07401	99%
LG	Ceratite	T4	U07413	98%
WAL	Ceratite	T4	AF019060	97%
		T4	AF019061	97%
		T4	U07413	97%
		T4	U07416	97%
OPH	Poeira hospitalar	T11	AF019068	98%
AP2	Ceratite	T4	ATCC30461	100%
AP4	Água	T4	ATCC30782	100%

Ao comparar as sequências das amostras deste trabalho com sequências de várias cepas do *Genbank* (Banco de Sequências nucleotídicas do NCBI), para a identificação específica, obteve-se que os isolados AR, AR11, ALX, e OPH foram identificados como: *A. quina*; *A. polyphaga*; *A. castellanii*; e *A. hatchetti*, respectivamente, com 99% de similaridade. Com os demais isolados, a determinação da espécie não foi realizada, pois apresentaram máxima similaridade com mais de uma espécie. O isolado AR14, por exemplo, apresentou 99% de similaridade com 3 espécies diferentes: *A. polyphaga*, *A. rhyodes* e *A. lugdunensis* (**Tabela 7**).

Tabela 7: Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre os isolados e as sequências de espécies publicadas no *Genbank* (banco de sequências nucleotídicas do NCBI). AR, WAL, LG, ALX: Isolados clínicos obtidos de lesão de ceratite amebiana; AR11, AR14, AR15: Isolados ambientais obtidos de poeira doméstica; OPH: isolado ambiental obtido de ambiente hospitalar.

ISOLADO	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO AO GENBANK	SIMILARIDADE MÁXIMA
AR	<i>A. quina</i>	AY703023	99%.
AR11	<i>A. polyphaga</i>	U07407; DQ013363	99%
AR14	<i>A. polyphaga</i>	AY026243; DQ013363; U07407	99%
	<i>A. rhysodes</i>	AF260720	
	<i>A. lugdunensis</i>	AF260718	
AR15	<i>A. hatchetti</i>	AF251937; AF019068	98%
	<i>A. polyphaga</i>	DQ013363; AY237735	
	<i>A. triangularis</i>	AF316547	
	<i>A. quina</i>	AY703023	
	<i>A. castellanii</i>	AF260721	
	<i>A. rhysodes</i>	AF260720	
	<i>A. lugdunensis</i>	AF260718	
ALX	<i>A. castellanii</i>	U07401	99%
LG	<i>A. quina</i>	AY703023	99%
	<i>A. polyphaga</i>	AF260725	
	<i>A. palestinensis</i>	AF260719	
WAL	<i>A. hatchetti</i>	AF019060	97%
	<i>A. polyphaga</i>	AF019061	
	<i>A. castellanii</i>	U07413; U07416; AF114438	
OPH	<i>A. hatchetti</i>	AF251937	99%

5.3.3 Similaridade entre os isolados de ceratite e ambientais

Ao analisar a porcentagem de similaridade entre os isolados da residência do paciente com o isolado clínico AR, obteve-se que os mais próximos são os isolados AR11 com apenas cinco nucleotídeos diferentes e o AR14 com apenas quatro. O isolado AR15 mostrou-se o mais distante com 31 nucleotídeos diferentes. Quando esta comparação foi realizada entre todos os isolados, verificou-se que os isolados AR e LG, ambos clínicos, possuem apenas um nucleotídeo diferente e são portanto as linhagens mais próximas (**Tabela 8**).

Tabela 8: Número de nucleotídeos diferentes encontrados entre os isolados de *Acanthamoeba*, pela análise das distâncias par a par de diferenças nucleotídicas, utilizando o programa MEGA 3 (KUMAR et al, 2004), a partir das sequências obtidas pelo sequenciamento parcial do gene 18S rDNA. AR, WAL, LG, ALX: Isolados clínicos obtidos de lesão de ceratite amebiana; AR11, AR14, AR15: Isolados ambientais obtidos de poeira doméstica.

ISOLADOS	AR	AR11	AR14	AR15	ALX	LG	WAL
AR	0						
AR11	5	0					
AR14	4	4	0				
AR15	31	29	25	0			
ALX	14	3	7	32	0		
LG	1	5	4	31	14	0	
WAL	10	6	11	36	14	10	0

5.4 Ensaios de termotolerância e osmotolerância

5.4.1 Termotolerância

a) Cultivo dos isolados clonados em meio ágar soja com bactérias

As culturas em ágar soja apresentaram crescimento detectável a partir de 48 h de cultivo, atingindo o máximo de 2,5 a 4 cm nas temperaturas de 28 °C e 37 °C (**Figura 8**).

As médias das taxas de crescimento foram significativamente maiores na temperatura de 37 °C que a 28 °C (ANOVA, $p < 0,05$). Ao analisar individualmente as taxas de crescimento de cada isolado, observou-se que todos apresentaram maior velocidade de crescimento a 37 °C ($p < 0,05$, teste de Bonferroni), com exceção da cultura do isolado ALX (**Tabela 9**). Nenhum isolado apresentou crescimento na temperatura de 42 °C.

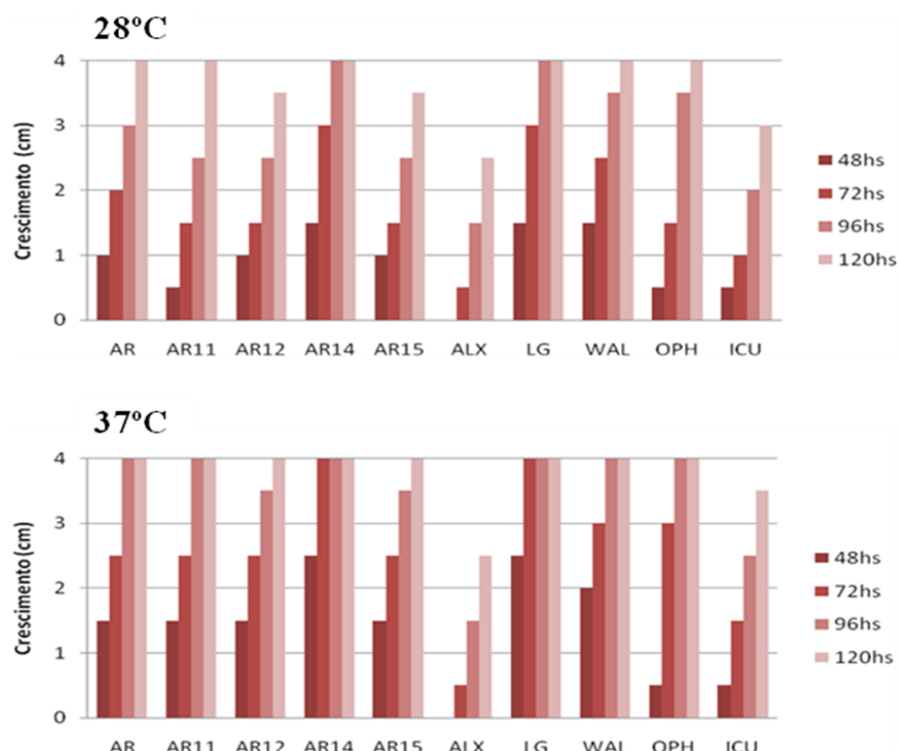


Figura 8. Cinética de crescimento de culturas clonadas de *Acanthamoeba* nas temperaturas de 28 °C e 37 °C, em meio ágar soja com bactérias (*Escherichia coli*). O crescimento máximo na placa corresponde a 4 cm.

Tabela 9. Taxa média de crescimento das culturas de *Acanthamoeba* em ágar soja com bactérias nas temperaturas de 28 °C, 37 °C e 42 °C.

Cultura	Origem	Taxa de crescimento (cm/h) ^a		
		28 °C	37 °C	42 °C
AR	Ceratite	0,0333	0,0417 ^b	-
AR11	Poeira doméstica	0,0333	0,0417 ^b	-
AR12	Poeira doméstica	0,0292	0,0333 ^b	-
AR14	Poeira doméstica	0,0417	0,0833 ^b	-
AR15	Poeira doméstica	0,0292	0,0333 ^b	-
ALX	Ceratite	0,0208	0,0208	-
LG	Ceratite	0,0417	0,0833 ^b	-
WAL	Ceratite	0,0333	0,0417 ^b	-
OPH	Poeira hospitalar	0,0333	0,0417 ^b	-
ICU	Poeira hospitalar	0,0250	0,0292 ^b	-

a. Média de 3 repetições, cada uma calculada pela fórmula D/It , onde D= distância do halo de crescimento em relação ao diâmetro do inóculo inicial e It= intervalo de tempo em horas.

b. Taxas de crescimento significativamente maiores ($p < 0,05$) em relação às taxas de crescimento na temperatura de 28 °C. Comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni.

b) Cultivo dos isolados clonados em meio PYG no sistema axênico

O perfil de crescimento das culturas axênicas durante uma semana de avaliação variou entre os diferentes isolados, tanto na temperatura de 28 °C como a 37 °C, porém a 42 °C apenas o isolado AP2 foi capaz de crescer no meio por um breve período (**Figura 9**). As maiores densidades de células obtidas na temperatura de 28 °C foram observadas com os isolados AR11 e AR14 (14 e 15,0 x10⁵ trof/mL, respectivamente), enquanto que a 37 °C, os isolados ALX e OPH (15,5 e 16,75 x 10⁵ trof/ mL, respectivamente) foram os de melhor rendimento (**Figura 9**).

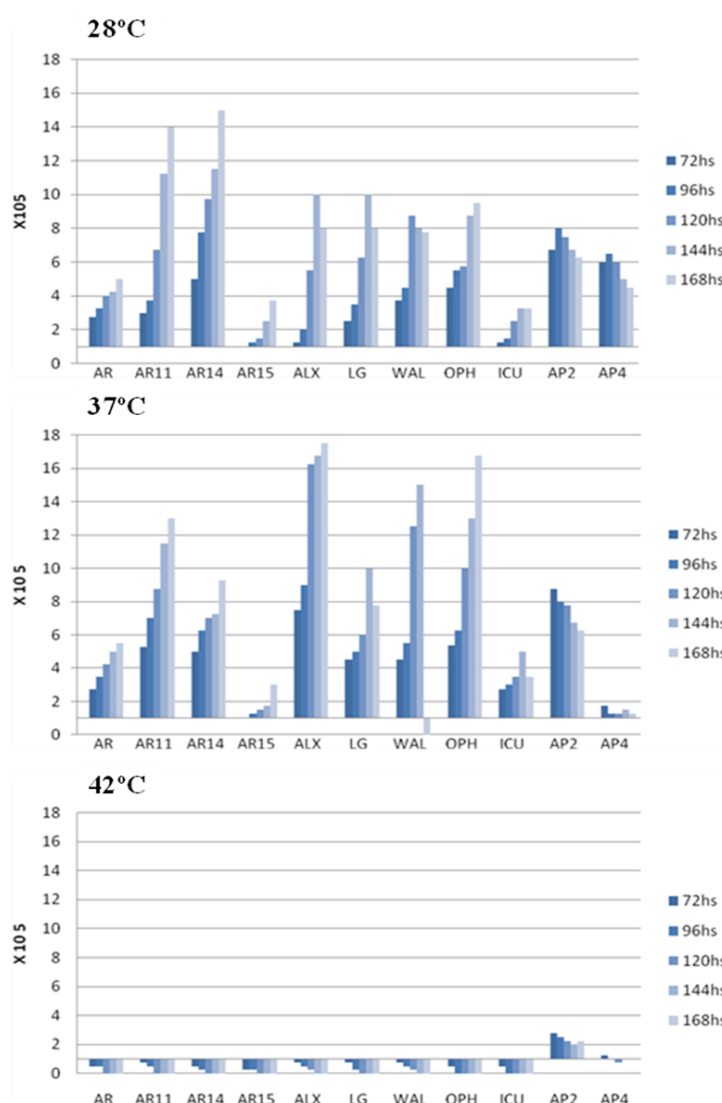


Figura 9. Cinética de crescimento de culturas clonadas de *Acanthamoeba* nas temperaturas de 28 °C, 37 °C e 42 °C, em 2,5 mL de meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal.

As taxas de crescimento foram significativamente maiores na temperatura de 37 °C do que na de 28 °C (ANOVA, $p < 0,05$). Nas análises individuais (cada isolado nas diferentes temperaturas), duas culturas de isolados clínicos (ALX e AP2) e uma de isolado ambiental (OPH) cresceram mais em 37 °C, enquanto duas culturas de isolados ambientais (AR14 e AP4) desenvolveram-se menos nesta temperatura do que em 28 °C ($p < 0,05$, teste de Tukey) (**Tabela 10**).

Tabela 10. Taxa média de crescimento de culturas axênicas de *Acanthamoeba* com inóculo de 10^5 trofozoítos por mL, em 2,5 mL de meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal, nas temperaturas de 28 °C, 37 °C e 42 °C.

Cultura	Origem	Taxa de crescimento (gerações/h) ^a		
		28 °C	37 °C	42 °C
AR	Ceratite	0,014	0,015	-
AR11	Poeira doméstica	0,023	0,022	-
AR14	Poeira doméstica	0,023	0,019 ^b	-
AR15	Poeira doméstica	0,011	0,009	-
ALX	Ceratite	0,023	0,025 ^b	-
LG	Ceratite	0,023	0,023	-
WAL	Ceratite	0,026	0,027	-
OPH	Poeira hospitalar	0,019	0,024 ^b	-
ICU	Poeira hospitalar	0,012	0,016 ^b	-
AP2	Ceratite – ATCC	0,031	0,043 ^b	0,020 ^b
AP4	Água – ATCC	0,028	0,011 ^b	-

a. Calculada pela fórmula $(\log NT - \log N0) / 0,301 \times T$, onde NT = densidade máxima de trofozoítos, N0 é o número de trofozoitos do inóculo inicial e T é o tempo em que foi atingida a densidade máxima.

b. Diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao crescimento na temperatura de 28 °C. Teste de Tukey.

5.4.2 Osmotolerância

a) Cultivo dos isolados clonados em meio ágar soja com bactérias

As culturas apresentaram crescimento máximo de 2 a 4 cm no meio contendo 0,1 M de manitol e de 1 a 3 cm na condição de 0,5 M, com exceção da amostra ICU que não cresceu nesta osmolaridade (**Figura 10**). Nas condições de 1,0 M, apenas o isolado ALX manteve-se viável, porém com baixa multiplicação (0,5 cm) (**Figura 10**).

As taxas de crescimento nos meios com manitol foram significativamente menores que no controle, sem manitol (ANOVA, $p < 0,05$), porém nas análises individuais (por amostra), não houve diferença significativa de crescimento em relação

ao controle para os isolados AR, AR11 e OPH em 0,1 M de manitol e o isolado ALX em 0,5 M ($p > 0,05$, teste de Bonferroni) (Tabela 11).

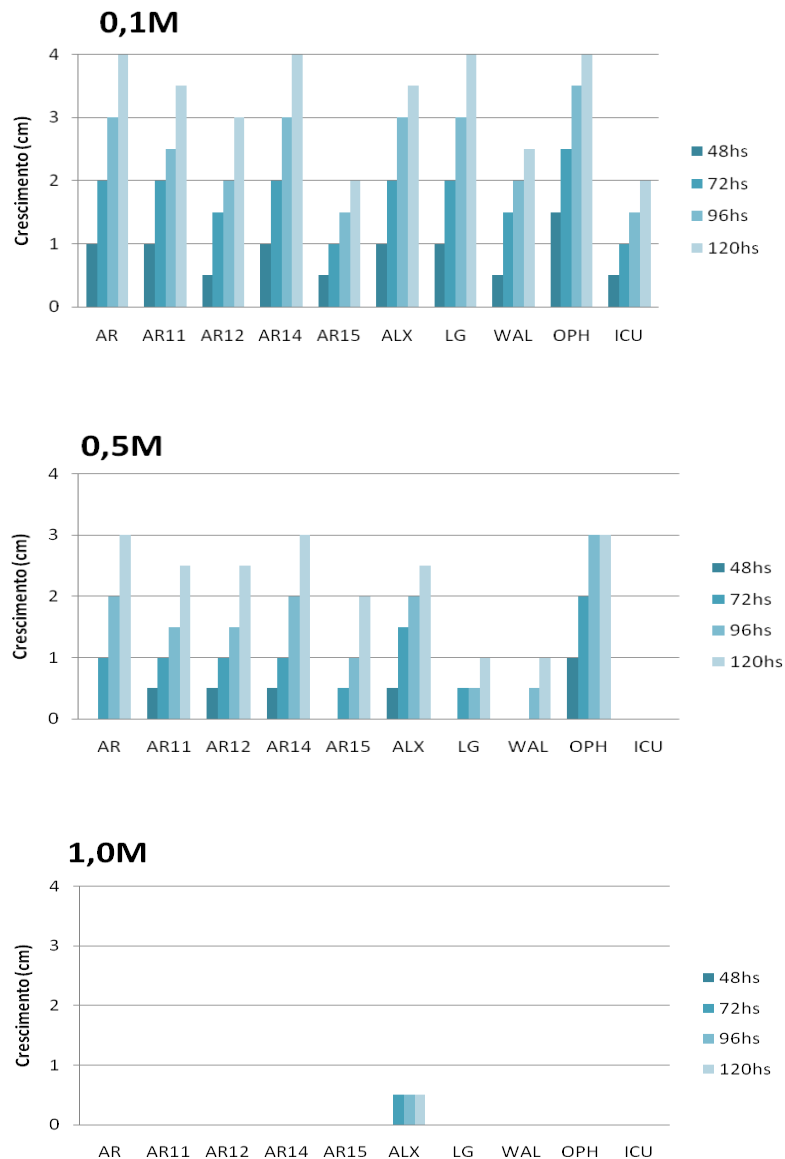


Figura 10. Cinética de crescimento de culturas clonadas de *Acanthamoeba* na temperatura de 28 °C em placa de meio ágar soja com bactérias (*Escherichia coli*), contendo 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M de manitol. O crescimento máximo na placa corresponde a 4 cm.

Tabela 11. Taxa média de crescimento das culturas de *Acanthamoeba* em ágar soja com bactérias na temperatura de 28 °C, em meio contendo manitol a 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M.

Cultura	Origem	Taxa de crescimento (cm/h) ^a			
		Controle	0,1 M	0,5 M	1,0 M
AR	Ceratite	0,0333	0,0333	0,0250 ^b	-
AR11	Poeira doméstica	0,0333	0,0278	0,0208 ^b	-
AR12	Poeira doméstica	0,0292	0,0264 ^b	0,0208 ^b	-
AR14	Poeira doméstica	0,0417	0,0333 ^b	0,0250 ^b	-
AR15	Poeira doméstica	0,0292	0,0167 ^b	0,0167 ^b	-
ALX	Ceratite	0,0208	0,0292	0,0208	0,0104 ^b
LG	Ceratite	0,0417	0,0333 ^b	0,0069 ^b	-
WAL	Ceratite	0,0333	0,0208 ^b	0,0069 ^b	-
OPH	Poeira hospitalar	0,0333	0,0333	0,0313 ^b	-
ICU	Poeira hospitalar	0,0250	0,0167 ^b	0,0167 ^b	-

a. Média de 3 repetições, cada uma calculada pela fórmula D/It , onde D= distância do halo de crescimento em relação ao diâmetro do inóculo inicial e It= intervalo de tempo em horas.

b. Taxas de crescimento significativamente menores ($p < 0,05$) em relação às taxas de crescimento na temperatura de 28 °C. Comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni.

b) Cultivo dos isolados clonados em meio PYG no sistema axênico

Com exceção do isolado AR15, todos os demais foram capazes de se desenvolver em cultivo axênico contendo 0,1 M de manitol. Somente os isolados ICU, AP2 e AP4 permaneceram viáveis a 0,5 M e apenas AP2 e AP4 sobreviveram a 1,0 M, embora por pouco tempo (**Figura 11**). Comparando o crescimento na condição controle (meio sem manitol) com os meios contendo manitol, observou-se queda significativa na taxa de crescimento nestes últimos (ANOVA $p < 0,05$). Nas análises individuais (por amostra), o efeito do aumento da osmolaridade resultou na diminuição da taxa de crescimento para a maioria das culturas ($p < 0,05$, Teste de Tukey) (**Tabela 12**).

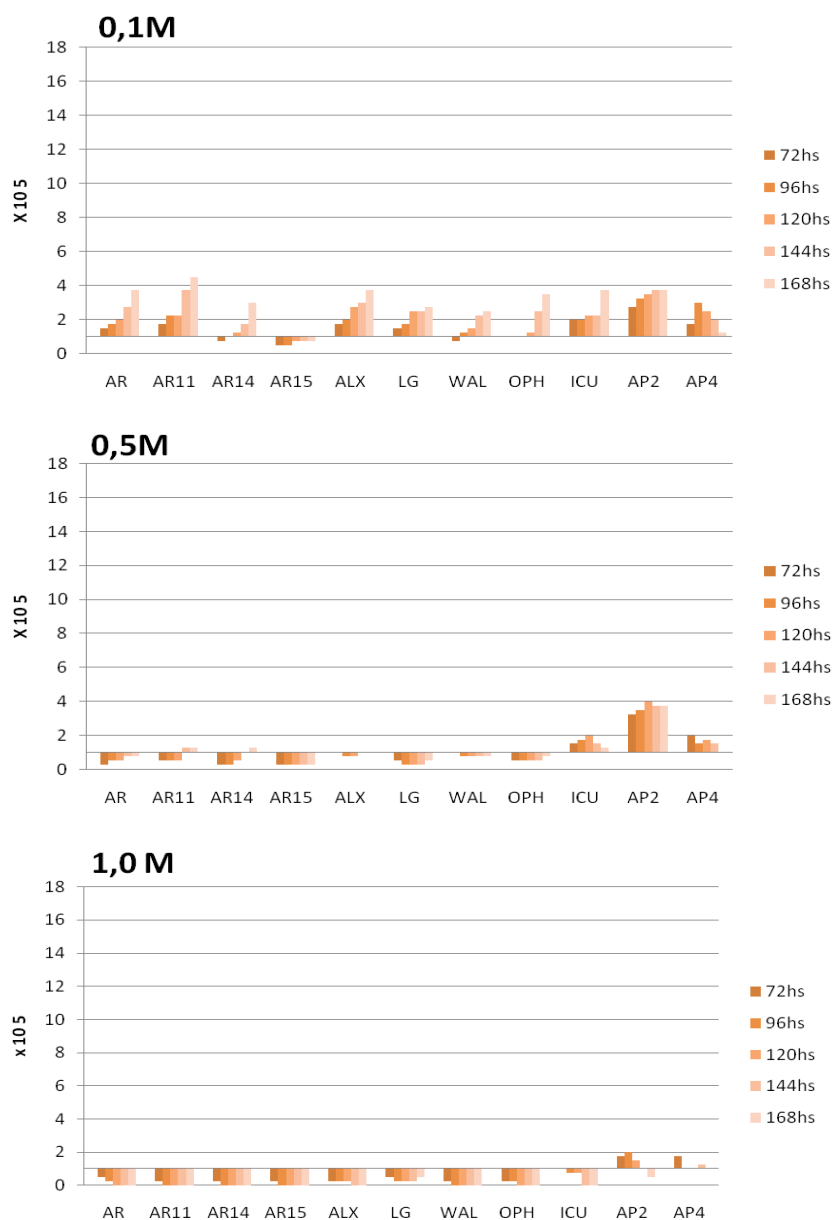


Fig. 11: Cinética de crescimento de culturas clonadas de *Acanthamoeba* na temperatura de 28 °C, em 2,5 mL de meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal e contendo 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M de manitol.

Tabela 12. Taxa média de crescimento das culturas de *Acanthamoeba* em meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal, à temperatura de 28 °C, em meio contendo manitol a 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M.

Cultura	Origem	Taxa de crescimento (gerações/h) ^a			
		Controle	0,1 M	0,5 M	1,0 M
AR	Ceratite	0,014	0,011 ^b	-	-
AR11	Poeira	0,023	0,013 ^b	0,002 ^b	-
AR14	Poeira	0,023	0,009 ^b	0,002 ^b	-
AR15	Poeira	0,011	-	-	-
ALX	Ceratite	0,023	0,011 ^b	-	-
LG	Ceratite	0,023	0,009 ^b	-	-
WAL	Ceratite	0,025	0,008 ^b	-	-
OPH	Poeira	0,019	0,011 ^b	-	-
ICU	Poeira	0,012	0,011	0,008 ^b	-
AP2	Ceratite –ATCC	0,031	0,011 ^b	0,017 ^b	0,010 ^b
AP4	Água – ATCC	0,028	0,009 ^b	0,011 ^b	0,014 ^b

a. Calculada pela fórmula $(\log NT - \log N0) / 0,301 \times T$, onde NT = densidade máxima de trofozoítos, N0 é o número de trofozoítos do inóculo inicial e T é o tempo em que foi atingida a densidade máxima.

b. Diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao crescimento na temperatura de 28 °C. Teste de Tukey.

5.4.3 Cultivo em meio ágar soja com bactérias versus cultivo axênico

Quando o desenvolvimento das culturas foi avaliado apenas em termos qualitativos (presença ou ausência de crescimento), observou-se que os isolados apresentaram o mesmo comportamento no cultivo em ágar soja e axênico nas diferentes temperaturas testadas (**Tabela 13**). Nos testes de osmotolerância, não foi observado correspondência de crescimento entre os dois tipos de cultivo para o isolado AR15 a 0,1 M de manitol, para todos os outros a 0,5 M e para o isolado ALX na concentração de 1,0 M de manitol. (**Tabela 13**).

Tabela 13. Termotolerância e osmotolerância dos isolados clonados de *Acanthamoeba* em meio ágar soja (AS) e em cultivo axênico (Ax) no meio PYG suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Cultura	Origem	Termotolerância						Osmotolerância					
		28 °C		37 °C		42 °C		0,1 M		0,5 M		1,0 M	
		AS	Ax	AS	Ax	AS	Ax	AS	Ax	AS	Ax	AS	Ax
AR	Ceratite	++	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
AR11	Poeira	++	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
AR12	Poeira	++	na	++	na	-	na	++	na	++	na	-	na
AR14	Poeira	++	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
AR15	Poeira	++	++	++	++	-	-	++	-	++	-	-	-
ALX	Ceratite	++	++	++	++	-	-	++	++	++	-	+	-
LG	Ceratite	++	++	++	++	-	-	++	+	++	-	-	-
WAL	Ceratite	++	++	++	++	-	-	++	+	++	-	-	-
OPH	Poeira	++	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
ICU	Poeira	++	++	++	++	-	-	++	++	-	+	-	-
AP2	Ceratite	na	++	na	++	na	+	na	++	na	+	na	+
AP4	Água	na	++	na	+	na	-	na	++	na	+	na	+

(+ +): Densidade máxima $> 2 \times 10^5$ trof/mL para cultivo axênico e crescimento acima de 0,5 cm para cultivo em ágar soja.

(+): Densidade máxima até 2×10^5 trof/mL para cultivo axênico.

(-): Não houve crescimento ou foi considerado insignificante.

na: Não avaliado.

6 DISCUSSÃO

Amostras clínicas obtidas de pacientes com suspeita de infecção da córnea por *Acanthamoeba*, geralmente são analisadas por meio de isolamento, cultivo do agente etiológico e testes utilizados para identificação do patógeno. Este é o modo pelo qual ocorre a confirmação de que a ameba é o verdadeiro agente causal da infecção. Neste trabalho, as culturas contendo os isolados provenientes da cidade de Vitória-ES foram recebidas em meio ágar soja e com diagnóstico de *Acanthamoeba*, confirmado posteriormente por análises morfológicas e moleculares.

A cultura em ágar é a técnica laboratorial geralmente utilizada para permitir a identificação de *Acanthamoeba*. Tanto isolados clínicos como os ambientais podem crescer em um ágar não nutriente ou pobremente enriquecido contendo uma cultura de bactérias (*Escherichia. coli* ou *Enterobacter aerogenes*) para serem utilizadas na alimentação destas amebas. Foronda (1979) realizou um estudo comparativo entre vários meios de cultura que estavam sendo utilizados para o crescimento de Amebas de

Vida Livre e comprovou a eficiência do meio ágar soja. Por este motivo optou-se por usar este meio para o cultivo dos isolados utilizados neste trabalho.

Para os estudos fisiológicos e moleculares, optou-se por utilizar culturas clonadas a partir dos isolados originais. A obtenção dos clones possibilita trabalhar com culturas homogêneas, pois todos os trofozoítos da cultura originam-se da divisão de um único trofozoíto inicial. Desta forma, evita-se que, em estudos subsequentes, como o sequenciamento gênico e avaliação de termotolerância e osmotolerância, haja dificuldades de interpretação devido à presença de linhagens diferentes na cultura.

A partir das culturas clonadas, foi realizada a axenização em meio PYG. Obteve-se desta forma, a manutenção das mesmas linhagens em duas condições diferentes de cultivo: Culturas clonadas em meio de cultivo ágar soja com bactérias e culturas clonadas em meio PYG no sistema axênico.

De acordo com a literatura, a maioria dos isolados de *Acanthamoeba* consegue se adaptar às condições axênicas de cultivo, exceto algumas cepas mais exigentes que requerem suplementos nutricionais adicionais como soro e vitaminas para o seu desenvolvimento (DE JONCKHEERE, 1980; SCHUSTER, 2002). Considerando que relatos anteriores mostraram que não foi possível axenizar uma linhagem do isolado OPH em meio PYG (COSTA et al, 2009), optou-se por suplementar este meio com soro bovino fetal em todas as tentativas de axenização do presente estudo. Apesar desta suplementação, um dos isolados, AR12, não se adaptou ao cultivo axênico.

A sobrevivência em condição axênica tem sido citada por alguns autores como um critério indicador de patogenicidade, uma vez que isolados patogênicos são mais adaptados a diferentes ambientes e, por este motivo, possuem maior capacidade de sobreviver e se desenvolver como parasitas no organismo humano (DE JONCKHEERE, 1980; WALOCHNIK et al, 2000; KHAN et al, 2001). Considerando o critério estabelecido por estes autores, o isolado AR12 utilizado neste trabalho, por ser um isolado ambiental e não ter se desenvolvido em condição axênica, poderia ser considerado de baixo potencial patogênico. No entanto, conforme será discutido mais adiante, o uso de um único critério parece não ser adequado para qualificar o potencial patogênico de *Acanthamoeba*.

Para a identificação do gênero dos isolados, a análise morfológica efetuada baseou-se na descrição da morfologia típica realizadas por Page (1988) e Pussard e Pons (1977). A morfologia de todos os isolados originais estudados neste trabalho confirma as características do gênero *Acanthamoeba*. Outro nível de classificação morfológica de

Pussard e Pons (1977) envolve a inclusão dos isolados, de acordo com a morfologia cística, nos grupos I, II e III. O grupo II é conhecido por incluir a maioria dos isolados clínicos já descritos, até mesmo os de ceratite amebiana (WALOCHNIK et al, 2000). Neste trabalho, a maioria dos isolados apresentou características morfológicas do grupo II, com a exceção do isolado ICU, o qual foi obtido de ambiente hospitalar e classificado como pertencente ao grupo I. No entanto, pelo menos até o momento, a informação do grupo não fornece confirmação quanto à patogenicidade dos isolados, pois o grupo II é também considerado o mais prevalente na natureza (WALOCHNIK et al, 2000). Os resultados também mostram que dentre os quatro isolados do ambiente doméstico de um dos pacientes com ceratite, três (AR11, AR12 e AR14) apresentaram semelhança morfológica com o isolado clínico (AR) e por este motivo, poderiam estar relacionados com a fonte de infecção do paciente.

Além da identificação morfológica do gênero *Acanthamoeba*, a confirmação do gênero também foi obtida por meio de um ensaio de PCR, cuja técnica foi descrita por Khan e Paget (2002), e fundamentada pela utilização de *primers* que amplificam uma região bastante conservada em *Acanthamoeba*, localizada dentro do gene 18S rDNA, perfeitamente capaz de discriminar somente este gênero. Esta PCR foi inicialmente aplicada para confirmar o gênero dos isolados originais de *Acanthamoeba*, por ter sido previamente validada em trabalhos anteriores do grupo (COSTA et al, 2009). Considerando que em amostras ambientais podem estar presentes outros gênero de Amebas de Vida Livre que podem ser similares a *Acanthamoeba*, a confirmação por PCR fornece um suporte adicional à identificação (KONG e CHUNG, 1996; KHAN e PAGET, 2002; COSTA et al, 2009).

Embora a identificação de *Acanthamoeba* em nível de gênero seja suficiente para fechar o diagnóstico em casos de ceratite infecciosa, o estudo taxonômico das espécies tem sido utilizado na identificação de linhagens que apresentem maior potencial para causar doenças.

Para a identificação morfológica específica, os critérios de Pussard e Pons (1977) e Page (1967) levam em consideração características como tamanho do cisto; formato de endo e ectocisto; número de braços do endocisto; dobramentos do ectocisto; número e características dos poros ou opérculos, como por exemplo, seu formato e presença ou ausência de protuberâncias. Consideraram também características citoplasmáticas, como presença de grânulos em regiões próximas a membrana citoplasmática e nuclear. Vários autores tentaram realizar a identificação morfológica

específica seguindo estes modelos, porém, a grande maioria deles verificou não haver uma boa correlação com os resultados de testes moleculares (ARMSTRONG, 2000; WALOCHNIK et al, 2000; 2001; KHAN et al, 2001; DA ROCHA-AZEVEDO e COSTA e SILVA-FILHO, 2007). Além disso, a morfologia cística varia conforme o cultivo, até mesmo em culturas de amebas que derivam de um clone, pois polimorfismo intraespecífico é comum em *Acanthamoeba* (ARMSTRONG, 2000; WALOCHNIK et al, 2000). Os próprios autores que propuseram este esquema de identificação admitem que é comum encontrar em culturas clonadas, alterações no número de poros e braços (PAGE, 1967; PUSSARD E PONS, 1977). Considera-se, portanto, que esta identificação é problemática e inconsistente para a determinação das espécies.

Atualmente, vários grupos de pesquisa têm desenvolvido e utilizado técnicas de análises moleculares para elucidar a taxonomia das espécies. A técnica de sequenciamento parcial do gene 18S rDNA foi escolhida neste trabalho por ser a mais utilizada para a caracterização genotípica de *Acanthamoeba*. Doze genótipos distintos foram descritos por Stothard et al (1998), baseado na reconstrução filogenética que inclui 1846 pares de base obtidos com este gene completo. Posteriormente, outros pesquisadores tiveram como objetivo descobrir uma sequência menor, mas que também poderia ser utilizada. Assim, se reduziria o tempo e os custos envolvendo o sequenciamento do gene inteiro. Como parte destes estudos, Schroeder et al (2001), demonstraram que um par de *primers* para PCR, denominados JDP1 e JDP2, produz um amplificado que é realmente específico para *Acanthamoeba*. Este amplificado, designado ASA.S1 (*Acanthamoeba specific amplimer S1*), possui tamanho que pode variar de 423 a 551 pares de base e foi obtido a partir de todos os genótipos dos isolados de *Acanthamoeba* que foram por eles estudados.

Este amplificado possui variações em sequências interespecíficas suficientes para distinguir muitos genótipos, sendo que a sequência gênica localizada entre 1271 e 1383 pares de base, que codifica a extremidade 5' do gene 18S rDNA a partir do braço 29 e a maioria do 29-1, poderia ser aceitável para este propósito, uma vez que essa região é altamente variável e expandida em *Acanthamoeba* (SCHROEDER et al, 2001).

A partir dos dados deste pesquisador, vários outros grupos têm utilizado o sequenciamento do fragmento gerado pelos *primers* JDP para caracterização genotípica de *Acanthamoeba* (BOOTON et al, 2002; BOOTON et al, 2005; LORENZO-MORALES et al, 2007).

Os resultados do sequenciamento gênico dos isolados clonados utilizados neste trabalho indicaram que as amostras estudadas apresentam altas porcentagens de similaridade com sequências já descritas no banco de sequências nucleotídicas do NCBI para o gênero *Acanthamoeba*. Não foi possível determinar a sequência nucleotídica de dois isolados (AR12 e ICU), pois como resultado do sequenciamento gênico apareceram múltiplos picos para o mesmo nucleotídeo no eletroferograma. Estas amostras também foram clonadas a partir de um único trofozoíto, logo, os múltiplos picos não poderiam ter sido consequência de linhagens diferentes na cultura. Uma possível explicação é que estas amostras apresentem mais de um alelo para a sequência avaliada, necessitando da técnica de clonagem molecular em plasmídeo. De fato, há evidências de que mais de um alelo do gene 18S rDNA pode ser encontrado em *Acanthamoeba* (STOTHARD et al, 1998). Ainda não está claro quais espécies têm mais de um alelo. A experiência de Stothard et al, (1998) mostra que a maioria dos isolados tem um alelo predominante que resulta em uma única sequência. Com base nos dados obtidos por este pesquisador, a variação entre as sequências dos alelos é menor do que entre as sequências de diferentes isolados dentro de um tipo sequencial. Sendo assim, a seleção dos alelos não teria um maior impacto na classificação, pois os vários alelos de um único isolado parecem pertencer ao mesmo genótipo.

Das amostras que foram sequenciadas no presente trabalho, obteve-se que todos os isolados clínicos obtidos de pacientes com ceratite amebiana, pertencem ao genótipo T4. Dois dos isolados que foram obtidos do ambiente doméstico de um destes pacientes também foram agrupados neste genótipo. Ainda não está bem claro se o genótipo T4 representa o genótipo evolutivo das amebas causadoras da ceratite amebiana ou se é o mais encontrado entre estes isolados por ser também o mais abundante na natureza. Na literatura, observa-se que este assunto tem sido motivo de muita discussão. Booton et al (2005), verificaram em seus experimentos que a maioria dos isolados de *Acanthamoeba* resultaram de um único tipo sequencial, o T4. A frequência deste genótipo variou dependendo do grupo estudado, sendo ele identificado em 55,3% dos isolados ambientais, 79,3% de isolados de infecções sistêmicas (encefalite amebiana, infecções cutâneas e pulmonares) e 94,3% dos obtidos de pacientes com ceratite amebiana. Em isolados de ceratite, dados similares foram obtidos por Stothard et al (1998), que encontraram genótipo T4 em 17 entre 18 isolados. Somente um pertencia ao genótipo T3. Estes pesquisadores sugerem que, devido a proximidade entre os tipos sequenciais T3 e T4, estes possam ter evoluído a partir de um ancestral comum durante o processo

de evolução de *Acanthamoeba* ao longo dos anos. De acordo com Walochnik et al (2000), a maioria dos isolados ambientais também pertence ao genótipo T4, mas concorda com a teoria sobre a evolução de *Acanthamoeba* citada por Stothard et al (1998), pois ao comparar a porcentagem de similaridade entre seus isolados do genótipo T4, verificaram que a semelhança era maior com as amostras clínicas que com as ambientais de outros grupos, o que sugeria que a capacidade de causar infecção poderia ter se perdido entre a espécie ao longo dos anos.

Neste trabalho, a genotipagem de *Acanthamoeba* confirmou a predominância do genótipo T4. Embora o número de amostras sequenciadas tenha sido pequeno, a frequência de 100% do genótipo T4 nas amostras clínicas e de 50% nas amostras ambientais foi próxima à que tem sido relatada por outros autores com isolados de outros países (STOTHARD et al, 1998; BOOTON et al, 2005). No Brasil, apenas dois trabalhos relatam a identificação genotípica de *Acanthamoeba* usando o sequenciamento de regiões de DNA ribossomal, porém a caracterização foi realizada com isolados ambientais (MAGLIANO et al, 2009; CARLESSO et al, 2010). Portanto, este trabalho é o primeiro que relata a genotipagem por sequenciamento do gene parcial 18S rDNA em amostras clínicas de pacientes com ceratite amebiana no país.

As análises de sequências também permitiram inferir sobre a proximidade genética entre os isolados obtidos neste trabalho. Comparando os isolados clínicos entre si, AR e LG possuem apenas 1 nucleotídeo diferente e são portanto as espécies mais próximas. De forma geral, os isolados clínicos mostraram-se relativamente próximos entre si, diferindo em no máximo 14 nucleotídeos. Além disso, como já mencionado anteriormente, todos pertencem ao genótipo T4. De acordo com Kong (2009), a taxonomia de *Acanthamoeba*, principalmente dentro do genótipo T4, não está claramente definida. Como as cepas deste tipo sequencial apresentam-se muito proximamente relacionadas, deveriam ser classificadas como uma única espécie, *A. castellani*. Sendo assim, os dados obtidos sobre a similaridade de sequência entre os isolados deste trabalho mostram que a infecção destes pacientes possa ser atribuída a uma mesma espécie de *Acanthamoeba*.

Quando analisados os isolados de poeira do ambiente doméstico de um dos pacientes (AR11, AR14, AR15) em comparação com o isolado clínico deste paciente (AR), observou-se que os isolados ambientais AR11 e AR14 possuem sequência nucleotídica bastante próxima a do isolado AR, com no máximo 5 nucleotídeos diferentes. A proximidade molecular entre estes isolados, aliada à semelhança

morfológica, sugere que representem uma mesma linhagem de *Acanthamoeba*, indicando que a fonte de infecção do usuário de lentes de contato poderia ser a poeira do ambiente doméstico. Já o isolado AR15 mostrou-se o mais distante, pois possui 31 nucleotídeos diferentes, além de pertencer ao outro genótipo (T11) e apresentar morfologia diferenciada, como a presença de ondulações mais espaçadas no ectocisto.

Outra análise que pode ser obtida a partir de dados do sequenciamento é a tentativa de identificação específica, a partir da comparação com sequências de cepas previamente descritas. Os resultados apresentados mostraram que até mesmo o sequenciamento gênico é duvidoso para a identificação específica. O isolado AR15, por exemplo, apresentou sua máxima similaridade com 7 espécies diferentes. Por causa destas inconsistências e devido à proximidade entre cepas dentro do genótipo T4, admite-se que as espécies pertencentes ao genótipo T4 realmente deveriam ser reclassificadas como uma espécie única (GAST et al, 1996, KONG, 2009). Mesmo grupos que utilizam outras sequências variáveis (como DNA mitocondrial e sequência ITS) para classificação de *Acanthamoeba*, têm encontrado dificuldade na especiação do gênero (KÖSHLER et al, 2006; XUAN et al 2008). Por este motivo, atualmente os investigadores preferem classificar um isolado de *Acanthamoeba* por seu genótipo do que pelo nome científico (KONG, 2009).

Independentemente das controvérsias acerca da classificação genotípica e específica de *Acanthamoeba*, é reconhecido que existem linhagens patogênicas e outras sem relevância clínica. Por isto, quando se trata de estudos envolvendo a caracterização de isolados de *Acanthamoeba* provenientes do ambiente, torna-se importante avaliar o potencial patogênico para determinar o risco para humanos.

A termotolerância foi proposta inicialmente por Griffin (1972) como característica de Amebas de Vida Livre patogênicas. O autor demonstrou que *Naegleria fowleri* sobrevivia em temperaturas de até 45 °C, enquanto que a outra espécie não patogênica *N. gruberi*, crescia somente até 37 °C. Com *Acanthamoeba*, observou que isolados virulentos para camundongos, ou seja, capazes de causar Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) após inoculação intranasal, cresciam até 37 °C, enquanto que a maioria dos não virulentos crescia somente abaixo desta temperatura. Posteriormente, De Jonkheere (1980) testou vários outros isolados, mostrando uma tendência daqueles considerados patogênicos em crescer a temperaturas de 37 °C e 40 °C.

Apesar de vários autores utilizarem o cultivo em ágar com bactérias e expressar resultados dos ensaios de termotolerância apenas mencionando se ocorre ou não

crescimento (WALOCHNIK et al, 2000; KHAN e TAREEN, 2003; LORENZO-MORALES et al 2005, 2007; CARLESSO et al 2010), neste trabalho optou-se por analisar inicialmente outro parâmetro, que foi taxa ou velocidade de crescimento, não só no meio ágar soja, como também no sistema axênico de cultivo. Com isto, buscou-se obter dados adicionais como o perfil de crescimento de cada amostra, se havia algum padrão de taxa de crescimento que pudesse ser correlacionado à patogenicidade do isolado e se o comportamento de cada isolado em diferentes sistemas de cultivo seria equivalente em relação a este parâmetro.

A maioria das culturas cresceu mais rapidamente na temperatura de 37 °C que a 28 °C em meio ágar soja, com exceção do isolado ALX que manteve a mesma taxa nas duas temperaturas. Porém, no cultivo axênico, esta tendência a maior taxa de crescimento na temperatura de 37 °C não se repetiu, pois em um dos cinco isolados clínicos (LG) o valor da taxa de crescimento foi o mesmo nas duas temperaturas e quatro isolados (AR11, AR14, AR15 e AP4) dentre os seis ambientais avaliados, apresentaram menor taxa de crescimento na temperatura de 37 °C. Na literatura, alguns autores estabeleceram relação entre taxa de crescimento e capacidade de causar infecção, ao observar em seus experimentos que os isolados clínicos cresciam mais rápido que os ambientais (KHAN et al, 2001; WALOCHNIK et al, 2001; DA ROCHA-AZEVEDO e COSTA E SILVA-FILHO, 2007). Segundo estes autores, cepas que apresentam crescimento mais rápido podem se estabelecer na infecção mais facilmente, já que formariam um número de amebas suficiente para causar infecção. Outro aspecto a ser destacado é que, para o desenvolvimento de lesão, os organismos precisam, no mínimo, sobreviver à temperatura corporal humana, que é de 37 °C (WALOCHNIK et al, 2000). De acordo com estas características, as amostras que apresentaram maior taxa de crescimento a 37 °C deveriam então ser classificadas como de maior potencial patogênico. No entanto, as variações das taxas de crescimento dentro do grupo das amostras clínicas, assim como no grupo das ambientais, indicaram que a velocidade ou taxa de crescimento pode ser variável entre diferentes linhagens, refletindo características individuais em sua capacidade de adaptação ao cultivo *in vitro*. Assim, não foi possível estabelecer uma relação entre valores de taxa de crescimento e patogenicidade. Apesar disto, conhecer o perfil de crescimento pode ser útil para se conhecer o rendimento e tempo necessário para obter culturas ricas e utilizá-las em experimentos laboratoriais.

Devido às dificuldades de interpretação da taxa de crescimento das amostras, a avaliação da termotolerância neste trabalho utilizou o critério de crescimento positivo ou negativo, conforme tem sido relatado em outros trabalhos. Na verdade, não existe uma padronização quanto às temperaturas exatas que devem ser utilizadas neste teste, pois alguns utilizam como discriminantes de patogenicidade as temperaturas de 37 °C somente (KHAN e TAREEN, 2003; LORENZO-MORALES et al 2005), de 37 °C e 40 °C (DE JONKHHERE, 1980, CARLESSO et al 2010) ou de 37 °C e 42 °C (KHAN et al, 2000; WALOCHNIK et al, 2000). A dinâmica do crescimento observada no presente trabalho mostrou que as culturas morrem quando ocorre o aumento da temperatura de 37 °C para 42 °C, exceto o isolado AP2 que foi o único capaz de resistir à temperatura de 42 °C, mas somente em cultivo axênico. Devido a esta característica, sugere-se que o isolado AP2 possa se desenvolver em temperatura corporal humana e resistir à temperatura mais alta como as ocasionadas pela febre, mostrando-se capaz de causar tanto ceratite amebiana, como também as infecções sistêmicas por *Acanthamoeba*, incluindo a EAG. De fato, esta cepa de referência foi caracterizada como patogênica em ensaios de citopatogenicidade por Da Rocha Azevedo e Costa-Silva Filho (2007). Neste raciocínio, todos os outros isolados testados neste trabalho, inclusive os ambientais, poderiam não ser capazes de causar infecções sistêmicas, mas ainda assim seriam patogênicos por crescer em temperaturas que lhe permitissem colonizar pelo menos a córnea humana. A maioria deles foi identificada como pertencente ao genótipo T4, o mais comum em infecções humanas e também o genótipo T11, que tem sido demonstrado em frequências menores nas infecções de córnea (BOOTON et al, 2009).

Quando a análise foi realizada de forma qualitativa, verificou-se que a comparação entre os dois sistemas de cultivo (água soja com bactérias e axênico), no que se refere ao comportamento das culturas nas diferentes temperaturas, revelou correspondência na resposta ao teste, indicando que o mesmo pode ser usado independente do sistema em que as amebas são mantidas.

Para complementar o presente estudo com um teste adicional de patogenicidade, foi utilizado também o teste de osmotolerância, proposto por Khan et al (2001). Este foi um ensaio de plaqueamento desenvolvido por apresentar correlação com os resultados do teste de efeito citopático, podendo substituí-lo como teste diagnóstico. É baseado no pressuposto de que somente isolados patogênicos de *Acanthamoeba* são capazes de crescer em altas concentrações osmóticas (1,0 M de manitol) (KHAN et al, 2001). A partir de então a maioria dos estudos envolvendo avaliação de osmotolerância de

Acanthamoeba tem adotado a osmolaridade de 1,0 M de manitol como limitante para *Acanthamoeba* não patogênica (WALOCHNIK et al, 2000; KHAN e TAREEN, 2003; LORENZO-MORALES et al 2005; CARLESSO et al 2010). Apesar disto, utilizou-se neste trabalho três osmolaridades diferentes (0,1, 0,5 e 1,0 M de manitol), pois buscou-se investigar se haveria alguma tendência nos valores das taxas de crescimento que pudessem ser associadas à patogenicidade.

De forma geral, o perfil de crescimento dos isolados diminuiu a partir da adição de manitol e também do aumento da sua concentração nos meios de cultivo. Este mesmo comportamento foi citado por Khan et al (2001), que também verificaram uma diminuição brusca no crescimento das cepas, tanto patogênicas quanto não patogênicas, com a adição de manitol.

Analisando os valores das taxas de crescimento obtidas, no entanto, observou-se que eram variadas dentro do grupo dos isolados clínicos e dos ambientais. Assim, da mesma forma que nos ensaios de termotolerância, não foi possível fazer correlação da taxa de crescimento com a patogenicidade no teste de osmotolerância. Deste modo, a interpretação do teste também passou a ser realizada com base na ausência ou presença de crescimento nas osmolaridades testadas.

Os resultados mostraram que em meio ágar soja, o isolado ALX foi o único que resistiu à concentração de 1,0 M de manitol. Isto leva a questionar se o fato de os demais isolados testados neste trabalho não terem se desenvolvido nesta condição de osmolaridade seria suficiente para classificá-los como não patogênicos, apesar de terem sido isolados da infecção ativa de córnea. Assim, é possível que a concentração de 1,0 M de manitol seja muito alta para discriminar isolados patogênicos e ao empregá-la como limitante para não patogênicas corre-se o risco de subestimar o potencial de causar doença de algum isolado.

Outras inconsistências foram encontradas durante a avaliação da osmotolerância em cultivo axênico. As cepas AP2 e AP4 axênicas, patogênica e não patogênica, respectivamente, conforme dados de citopatogenicidade (DA ROCHA-AZEVEDO e COSTA-SILVA FILHO, 2007), apresentaram ambas crescimento a 1,0 M de manitol. Isto novamente reforça a suspeita de que a resistência a esta concentração de 1,0 M de manitol não seja adequada para predizer a patogenicidade de *Acanthamoeba*. Além disto, isolados que apresentaram característica de potencial patogênico quando analisados neste sistema de cultivo axênico, não mostraram esta mesma característica quando cultivados em meio ágar soja. Por exemplo, um único isolado, AR15, não se

desenvolveu em concentrações de 0,1 M de manitol quando em cultivo axênico. Devido a esta característica de crescimento, este isolado poderia ser considerado como de menor potencial patogênico. No entanto, pela análise do seu perfil de crescimento nesta mesma concentração osmolar, mas em cultivo misto em ágar soja, observa-se que o mesmo se desenvolveu relativamente bem. E para os demais isolados, a ausência de correspondência dos resultados da osmotolerância ficou evidente quando avaliada a concentração de 0,5 M de manitol para todos os isolados e de 1,0 M para o isolado ALX.

Em resumo, os testes de osmotolerância e termotolerância são amplamente usados para prever o potencial patogênico de *Acanthamoeba*, porém nossos resultados indicaram que existem inconsistências em relação às temperaturas e/ou osmolaridade que seriam discriminantes de patogenicidade. Também observou-se que o cultivo axênico nem sempre reproduz os resultados obtidos no cultivo em ágar soja com bactérias. Devido à distribuição ubíqua destes protozoários na natureza, em contato extremo com microrganismos que inclusive são utilizados em sua alimentação, é possível que o cultivo com bactérias mimetize melhor as condições normais de seu habitat natural. O cultivo axênico, devido às necessidades nutricionais diferenciadas dos isolados, poderia, por si só estar inibindo o crescimento deles. Além disto, por ser realizado em meio líquido e em uma condição distinta da normalmente encontrada na natureza, a sensibilidade dos isolados frente às concentrações de manitol se torna maior.

7 CONCLUSÃO

1. Os isolados estudados no presente trabalho são do gênero *Acanthamoeba*, o que foi confirmado por meio de análise morfológica e por PCR (KHAN e PAGET, 2002), sendo que 90% apresentam características morfológicas do grupo II de Pussard e Pons (1977), o principal grupo encontrado em isolados clínicos deste protozoário.
2. No Brasil, este é o primeiro trabalho a relatar a genotipagem de isolados de ceratite amebiana por sequenciamento do gene parcial do gene 18S rDNA, e revelou uma frequência de 100% do genótipo T4 em amostras clínicas, o que confirma ser este o principal tipo sequencial encontrado em isolados de ceratite por *Acanthamoeba*.
3. Pela comparação da morfologia e também a da sequência nucleotídica de dois isolados ambientais (AR11 e AR14) com o respectivo isolado clínico (AR), conclui-se que a fonte de infecção do paciente era a poeira do ambiente doméstico.
4. Os valores da velocidade ou taxa de crescimento foram variáveis entre as linhagens e não mostraram um padrão característico relacionado ao grupo das amostras clínicas ou das ambientais. Portanto, a análise da taxa de crescimento não se mostrou eficiente para ser usada como critério de patogenicidade.
5. O cultivo axênico não reproduziu os resultados obtidos no cultivo em ágar soja com bactérias em relação ao teste fisiológico de osmotolerância. Além disto, as condições de temperatura e osmolaridade que têm sido tradicionalmente usadas como discriminantes de patogenicidade podem não ser adequadas para determinar esta característica em isolados de *Acanthamoeba*.

8 PERSPECTIVAS

Com este trabalho, foi possível realizar a caracterização molecular de quase todos os isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* que foram obtidos para o estudo, com exceção dos isolados AR12 e ICU que não tiveram suas sequências determinadas pelo sequenciamento gênico. Como continuidade, seria interessante realizar a clonagem molecular destes isolados para que suas sequências pudessem ser determinadas, possibilitando assim a sua caracterização molecular.

Apesar de o sequenciamento parcial do gene 18S rDNA representar a abordagem mais utilizada para a identificação genotípica de isolados de *Acanthamoeba*, a utilização de outras regiões gênicas, como sequências ITS1, por exemplo, poderiam ser também empregadas para estudos moleculares com estas amebas. Em pesquisa com *Acanthamoeba*, esta sequência foi avaliada em um único trabalho (KÖHSLER et al, 2006) Por representar uma região de alta variabilidade, a análise destas sequências tem o potencial de discriminar espécies proximalmente relacionadas, conforme tem sido observado em outros organismos (NILSSON et al, 2009). Por este motivo e como até o momento a classificação de *Acanthamoeba* encontra-se duvidosa e passível de mudanças, estudos com este marcador poderiam ser úteis na busca de uma taxonomia mais convincente.

Quanto à caracterização fisiológica, como os ensaios de termotolerância e osmotolerância apresentaram incoerências e não foram conclusivos na determinação da patogenicidade dos isolados, ensaios de inoculação destes isolados em animais experimentais e/ou células de cultura, poderiam ser usados para indicar de forma mais consistente o potencial patogênico de *Acanthamoeba*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADL, S. M., SIMPSON, A. G., FARMER, M. A., ANDERSEN, R. A., ANDERSON, O. R., BARTA, J. R., BOWSER, S. S., BRUGEROLLE, G., FENSOME, R. A., FREDERICQ, S., JAMES, T. Y., KARPOV, S., KUGRENS, P., KRUG, J., LANE, C. E., LEWIS, L. A., LODGE, J., LYNN, D. H., MANN, D. G., MCCOURT, R. M., MENDOZA, L., MOESTRUP, O., MOZLEY-STANDRIDGE, S. E., NERAD, T. A., SHEARER, C. A., SMIRNOV, A. V., SPIEGEL, F. W., TAYLOR, M. F. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **J Eukaryot Microbiol.** 52(5):399-451.
- AITKEN, D., HAY, J., KINNEAR, F. B., KIRKNESS, C. M., LEE, W. R., SEAL, D.V. 1996. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. **Ophthalmology.** 103(3):485-94.
- AKSOZEK, A., McCLELLAN, K., HOWARD, K., NIEDERKORN J.Y., ALIZADEH, H. 2002. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. **J. Parasitol.** 88: 621 – 623.
- ALVES, J.M., C.X. GUSMAO, M.M. TEIXEIRA, D. FREITAS, A.S. FORONDA, H.T. AFFONSO. 2000. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian Keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 33: 19 – 26.
- ANZIL, A.P., RAO, C., WRZOLEK, M.A., VISVESVARA, G.S., SHER, J.H., KOZLOWSKI, P.B. 1991. Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. Leptomyxid ameba. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 115: 21 – 25.
- ARMSTRONG, M. 2000. The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. **Infect. Dis. Rev.** 2: 65 - 73.
- BALDWIN, B. G., SANDERSON, M. J., PORTER, J. M., WOJCIECHOWSKI, M. F., CAMPBELL, C. S., DONOGHUE, M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Ann. Mo. Bot. Gard.** 82: 247 – 277.

- BARBEAU, J., T. BUHLER. 2001. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. **Res. Microbiol.** 152: 753 - 760.
- BARKER, J., T.J. HUMPHREY, M.W. BROWN. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. **FEMS Microbiol. Lett.** 173: 291 – 295.
- BIRTLES, R.J., T.J. ROWBOTHAM, C. STOREY, T.J. MARRIE, D. RAOULT. 1997. *Chlamydia*-like obligate parasite of free-living amoebae. **Lancet.** 349: 925 – 926.
- BOOTON, G. C., JOSLIN, C. E., SHOFF, M., TU, E.Y., KELLY, D. J., FUERST, P. A. 2009. Genotypic identification of *Acanthamoeba* sp. isolates associated with an outbreak of *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea.** 28(6):673-6.
- BOOTON, G. C., VISVESVARA, G. S., BYERS, T. J., KELLY, D. J., FUERST, P. A., 2005. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. **J Clin Microbiol.** 43(4):1689-93.
- BOOTON, G. C., KELLY, D. J., CHU, Y. W., SEAL, D. V., HOUANG, E., LAM, S. C., BYERS, T. J., FUERST, P. A. 2002. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. **Journal of Clinical Microbiology.** 1621 – 1625.
- BOWERS, B., KORN E. D. 1968. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. **The Journal of Cell Biology.** 39 (1): 95.
- BUTT, C.G. 1966. Primary amebic meningoencephalitis. **N. Engl. J. Med.** 274: 1473 – 1476.
- BUTT, C.G., C. BARO, R.W. KNORR. 1968. *Naegleria* (sp) identified in amebic encephalitis. **Am. J. Clin. Pthol.** 50: 568 – 574.
- CARLESSO, A. M., ARTUSO, G. L., CAUMO, K., ROTT, M. B. 2010. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. **Curr Microbiol. Mar;** 60(3):185-90.

- CASEMORE, D.P. 1977. Free-living amoebae in home dialysis unit. **Lancet**. 19; 2(8047):1078
- CASTELLANI, A. 1930. An amoeba found in cultures of a yeast: preliminary note. *J. Trop. Med. Hyg.* 33: 160.
- CHOMICZ, L., PADZIK, M., GRACZYK, Z., STAROSCIAK, B., GRACZYK, T. K., NAPRAWSKA, A., OLEDZKA, G., SZOSTAKOWSKA, B. 2010. *Acanthamoeba castellanii*: In vitro effects of selected biological, physical and chemical factors. **Exp Parasitol.** 6.
- CHUNG, D. I., KONG, H. H., YU, H. S., OH, Y. M., YEE, S. T., LIM, Y. J. 1996. Biochemical and molecular characterization of a strain KA/S2 of *Acanthamoeba castellanii* isolated from Korean soil. **Korean, J. Parasitol.** 34: 79 – 85.
- CHUNG, D., YU, H. S., HWANG, M. Y., KIM, T. H., KIM, T. O., YUN, H. C., KONG, H. H., 1998. Subgenus classification of *Acanthamoeba* by riboprinting. **The Korean Journal of Parasitology.** 36, (2): 69- 80.
- COSTA, A. O., CASTRO, E. A., FERREIRA, G. A, FURST, C., CROZETA, M. A., THOMAZ-SOCCOL, V., 2009. Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. **J Eukaryot Microbiol.**1;57(1):70-5.
- COSTAS, M., GRIFFITHS, A. J. 1984. The esterases and acid-phosphatases of *Acanthamoeba* (*Amoebida*, *Acanthamoebidae*). **Protistologica.** 20: 33 – 41.
- COSTAS, M., GRIFFITHS, A. J. 1986. Physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates. **J. Protozool.** 33: 304 – 309.
- CROZETTA, M. A. de S. 2007. Identificação morfológica e molecular de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* isoladas em poeira de ambiente hospitalar. Dissertação de mestrado (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Departamento de Patologia Básica do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- CULBERTSON, C.G., J.W. SMITH, H. MINNER. 1958. *Acanthamoebae*: observations on animal Pathogenicity. **Science.** 127: 1506.

- DA ROCHA-AZEVEDO, B., COSTA E SILVA-FILHO, F. 2007. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. **Arch. Microbiol.** 188:441–449.
- DA ROCHA-AZEVEDO, B., TANOWITZ, H., B., MARCIANO-CABRAL, F., 2009. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. **F. Interdiscip. Perspect Infect Dis.** 251406.
- DANELISHVILI, L., WU, M., STANG, B., HARRIFF, M., CIRILLO, S. L., CIRILLO, J. D., BILDFELL, R., ARBOGAST, B., BERMUDEZ, L. E., 2007. Identification of *Mycobacterium avium* pathogenicity island important for macrophage and amoeba infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 26; 104(26):11038-43.
- DE JONCKHEERE, J. F. 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** 39: 681 - 685.
- DE JONCKHEERE, J. F. 1983. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing and taxonomy of the genus *Acanthamoeba* spp. **Parasitol. Res.** 83: 345 – 348.
- DE JONCKHEERE, J.F. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. **Rev. Infect. Dis.** 13: S385 – S387.
- DENNEY, C.F., V.J. IRAGUI, L.D. UBER-ZAK, N.C. KARPINSKI, E.J. ZIEGLER, G.S. VISVESVARA, S.L. REED. 1997. Amebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*: case report and review. **Clin. Infect. Dis.** 25: 1354 – 1358.
- ERTABAKLAR, H., DAYANIR, V., APAYDIN, P., ERTUG, S., WALOCHNIK, J. 2009. Case report: *Acanthamoeba* keratitis. **Turkiye Parazit. Derg.** 33(4):283-5.
- EY, T. U., JOSLIN, C. E., SUGAR, J., SHOFF, M. E., BOOTON, G. C., 2008. The relative value of confocal microscopy and superficial corneal scrapings in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **Ophthalmology.** 115(11):1998-2003

- FORONDA, A.S. 1979. Observações sobre Amebas de Vida Livre potencialmente patogênicas. Tese de doutorado. Inst. Cienc. Biom. Univ. São Paulo.
- FOWLER, M., R.F. CARTER. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. **Br. Med. J.** 5464: 740 – 742.
- FRIEDLAND, L. R., RAPHAEL, S. A., DEUTSCH, E. S., JOHAL, J., MARTYN, L. J., VISVESVARA, G. S., LISCHNER, H. W., 1992. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. **Pediatr Infect Dis J.** 11(5):404-7
- GAST, R.J. 2001. Development of an *Acanthamoeba* -specific reverse *dotblot* and the discovery of a new ribotype. **J. Eukaryot. Microbiol.** 48: 609 – 615.
- GAST, R.J., LEDEE, D.R., FUERST, P.A., BYERS, T.J. 1996. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. **J. Eukaryot. Microbiol.** 43: 498–504.
- GAZE, W.H., BURROUGHS, N., GALLAGHER, M.P., WELLINGTON, E.M.H. 2001. Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*: a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. p. 155 – 157. In S. Billot-Bonef, P. A. Cabanes, F. Marciano – Cabral, P. Pernin, E. Pringuez (ed), International Meeting of the biology and Pathogenicity of free-living Amoebae Proceedings. John Libbey Eurotext, Paris, France.
- GELMAN, B.B., POPOV, V., CHALJUB, G., NADER, R., RAUF, S.J., NAUTA, H.W., VISVESVARA, G.S. 2003. Neuropathological and Ultrastructural Features of Amebic Encephalitis Caused by *Sappinia diploidea*. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.** 62(10):990-998.
- GELMAN, B.B., RAUF, S.J., NADER, R., POPOV, V., BORKOWSKI, J., CHALJUB, G., NAUTA, H. W. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. **JAMA.** 285: 2450-2451.

- GORDON, S. M., STEINBERG, J. P., DUPUIS, M. H., KOZARSKY, P. E., NICKERSON, J. F., VISVESVARA, G. S. 1992. Culture isolation of *Acanthamoeba* species and leptomycid amebas from patients with amebic meningoencephalitis, including two patients with AIDS. **Clin Infect Dis.** 15(6):1024-30.
- GRIFFIN, J. L, 1972. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. **Science.** 24;178(63):869-70.
- GUNDERSON, J. H., SOGIN, M. L., 1986. Length variation in eukaryotic rRNAs: small subunit rRNAs from the protists *Acanthamoeba castellanii* and *Euglena gracilis*. **Gene.** 44(1):63-70.
- HEWETT, M.K., ROBINSON, B.S., MONIS, P.T., SAINT, C.P., 2003. Identification of a new *Acanthamoeba* 18SrRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). **Acta Protozool.** 42: 325 – 219.
- HORN, M., FRITSCH, T.R., GAUTOM, R.K., SCHLEIFER, K.H., WAGNER, M. 1999. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. Related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. **Environ. Microbiol.** 1: 357 – 367.
- ILLINGWORTH, C.D., COOK , S.D., KARABATSAS, C.H., Easty, D.L. 1995. *Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome. **Br. J. Ophthalmol.** 79:1078–108.
- ILLINGWORTH, C.D., S.D. COOK. 1998. *Acanthamoeba* keratitis. **Surv. Ophthalmol.** 42: 493 – 508
- JAHNES, B., H.M. FULLMER, C.P. LI. 1957. Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue cultures. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 96: 484 - 488.
- JONES, B.R., VISVESVARA, G.S., ROBINSON, N. M. 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. Trans. **Ophthalmol. Soc. U. K.** 95:221-232.
- KARGER A. E., 1996. Separation of DNA sequencing fragments using an automated capillary electrophoresis instrument. **Electrophoresis.** 17(1):144-151.

- KENNEDY, S. M., DEVINE, P., HURLEY, C., OOI, Y.S., COLLUM, L. M. 1995. Corneal infection associated with *Hartmannella vermiformis* in contact-lens wearer. **Lancet**. 2;346(8975):637-8.
- KHAN, N.A., JARROLL, E.L., PANJWANI, N., CAO, Z., PAGET, T.A. 2000. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. **J. Clin. Microbiol.** 38(8):2858-61.
- KHAN, N.A.; E.L. JARROLL., T.A. PAGET. 2001. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Curr. Microbiol.** 43:204-208.
- KHAN, N. A., PAGET, T. A. 2002. Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. **Curr Microbiol.** 44(6):444-9.
- KHAN, N. A., TAREEN, N. K., 2003. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitol.*(2):97-104.
- KILVINGTON, S., BEECHING, J.R., WHITE, D.G. 1991. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. **J. Clin. Microbiol.** 29: 310 - 314.
- KILVINGTON, S., PRICE, J. 1990. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. **Journal of Applied Bacteriology.** 68 (5), 519-525.
- KIM, E. C., KIM, M. S., 2009. Bilateral *Acanthamoeba* Keratitis After Orthokeratology. **Cornea.** 16.
- KIM, Y. H., OCK, M. S., YUN, H. C., HWANG, M. Y., YU, H. S., KONG, H. H., CHUNG, D. I. 1996. Close relatedness of *Acanthamoeba pustulosa* with *Acanthamoeba palestinensis* based on isoenzyme profiles and rDNA PCR-RFLP patterns. Korean. **J. Parasitol.** 34(4): 259 – 266.
- KINGSTON, D., D.C. WARHURST. 1969. Isolation of amoebae from the air. **J. Med. Microbiol.** 2: 27 – 36.

- KÖHSLER, M., LEITNER, B., BLASCHITZ, M., MICHEL, R., ASPÖCK, H., WALOCHNIK, J. 2006. ITS1 sequence variabilities correlate with 18S rDNA sequence types in the genus *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebozoa). **Parasitol. Res.** 98(2): 86 – 93.
- KONG, H. H., 2009. Molecular phylogeny of *Acanthamoeba*. **Korean J Parasitol.** 47 Suppl: S21-8. Review.
- KONG, H. H., CHUNG, D. I., 1996. PCR and RFLP variation of conserved region of small subunit ribosomal DNA among *Acanthamoeba* isolates assigned to either *A. castellanii* or *A. polyphaga*. **Korean J Parasitol.** 34(2):127-34.
- KONG, H. H., PARK, J. H., CHUNG, D. I. 1995. Interstrain polymorphisms of isoenzyme profiles and mitochondrial DNA fingerprints among seven strains assigned to *Acanthamoeba polyphaga*. **Korean. J. Parasitol.** 33(4): 331 – 340.
- KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics.** 5(2):150-63.
- LA SCOLA, B., D. RAOULT. 2001. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. **Clin. Microbiol. Infect.** 7: 75 – 79.
- LACKNER, P., BEER, R., BROESSNER, G., HELBOK, R., PFAUSLER, B., BRENNEIS, C., AUER, H., WALOCHNIK, J., SCHMUTZHARD, E., 2010. Acute granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis in an immunocompetent patient. **Neurocrit Care.** 12(1):91-4.
- LARKIN, D. F., KILVINGTON, S., EASTY, D. L. 1990. Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. **Br J Ophthalmol.** 74(3):133-5.
- LEDEE, D.R., BOOTON, G. C., AWWAD, M. H., SHARMA, S., AGGARWAL, R. K., NISZL, I. A., MARKUS, M. B., FUERST, P. A., BYERS, T. J. 2003. Advantages of using mitochondrial 16S rDNA sequences to classify clinical isolates of *Acanthamoeba*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 44(3): 1142 – 1149.

- LEE, W. B., GOTAY, A. 2010. Bilateral *Acanthamoeba* Keratitis in Synergeyes Contact Lens Wear: Clinical and Confocal Microscopy Findings. **Eye Contact Lens**. 8.
- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E.G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R., LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E.G., PAGE, F.C., POLJANSKI, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J., WALLACE, F.G. 1980. A newly revised Classification of the Protozoa. **J. Protozool.** 27(1): 37 – 58.
- LORENZO-MORALES, J., MONTEVERDE-MIRANDA, C. A., JIMENEZ, C., TEJEDOR, M.L. VALLADARES, B.; ORTEGA-RIVAS, A. 2005. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. **Ann Agric Environ Med**. 12 (2):233-6.
- LORENZO-MORALES, J., MARTINEZ-CARRETERO, E., BATISTA, N., ALVAREZ-MAREN, J., BAHAYA, Y., WALOCHNIK, J., WALADARES, B. 2007. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmanella*. **Parasitol. Res.** 102(1):167 - 169.
- MAGLIANO A. C. M., SILVA, F. M., TEIXEIRA, M. G., ALFIERI, S. C. 2009. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. **Experimental Parasitology**. 123(3): 231-235.
- MARCIANO-CABRAL, F. e CABRAL, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clin. Microbiol Rev.** 16 (2): 273-307.
- MARTINEZ, A.J., G.S. VISVESVARA. 1991. Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxida*. **Clin. Lab. Med.** 11: 861 – 872.
- MARTINEZ, A.J., G.S. VISVESVARA. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathol.** 7: 583 - 598.
- MARTINEZ, J. M., GUERRA. A. E., GARCIA-TAMAYO, J., CÉSPEDES, G., GONZÁLES-ALFONZO, J., VIVESVARA, G. 1994. Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of spontaneous case from Venezuela. **Acta Neuropathol.** 87:430- 4.

- MARTINEZ, J.M., SOTELO-AVILA, C., ALCALÁ, H., WILLAERT, E. 1980. Granulomatous encephalitis, intracranial arteritis and mycotic aneurysm due to a free-living amoeba. **Acta Neuropathol.** 49: 7-12.
- MAZUR, T., E. HADAS, I. IWANICKA. 1995. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Trop. Med. Parasitol.** 46: 106 – 108.
- MERGERYAN, H. 1991. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. **Rev. Infect. Dis.** 13: S390 – S391.
- MICHEL, R., B. HAURODER-PHILIPPEZYK, K. MULLER, I. WEISHAAR. 1994. *Acanthamoeba* from human nasal mucosa infected with an obligate intracellular parasite. **Eur. J. Protistol.** 30: 104 – 110.
- NAGINGTON, J., P.G. WATSON, T.J. PLAYFAIR, J. MCGILL, B.R. JONES, AND A.D. STEELE. 1974. Amoebic infection of the eye. **Lancet.** 1537-1540.
- NIEDERKORN, J.Y., H. ALIZADEH, H. LEHER, J.P. McCULLEY. 1999. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Spinger Semin. Immunopathol.** 21: 147-160.
- NILSSON, R., RYBERG, M., ABARENKOV, K., SJÖKVIST, E., KRISTIANSSON, E. 2009. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. **FEMS Microbiology Letters.** 296:97–101.
- NWACHUKU, N., GERBA, C. P. 2004. Health effects of *Acanthamoeba* spp. And its potencial for waterborne transmission. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** 180: 93 – 131.
- OROZCO, E., SUÁREZ, M. E., SÁNCHEZ, T. 1985. Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from *Entamoeba histolytica*, strain HM1:IMSS. **Int J Parasitol.** 15(6):655-60.
- PAGE, F.C. 1967. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **J. Protozool.** 14: 709 – 724.

- PAGE, F.C. 1974. *Rasculus ithacus* Hawes, 1963 (*Amoebida*, *Flabellidae*) and the amphizoic tendency in amoebae. **Acta Protozoology**. 13, 143-154.
- PAGE, F.C. 1988. A new key to Freshwater and soil Gymnamoebae. **Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK**. 122pp
- PASZKO-KOLVA, C., YAMAMOTO, M. SHAHAMAT, T.K. SAWYER, G. MORRIS, R.R.COLWELL. 1991. Isolation of amoebae and *Pseudomonas* and *Legionella* spp. from eyewash stations. **Appl. Environ. Microbiol.** 57:163-167.
- PUSSARD, M., R. PONS. 1977. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**. 13: 557-610.
- RADFORD, C. F., LEHMANN, O. J., DARK, J. K., 1998. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. National *Acanthamoeba* Keratitis Study Group. **Br. J. Ophthalmol.** 82(12):1387 – 92.
- RIVERA, F., F. LARES, E. GALLEGOS, E. RAMIREZ, P. BONILLA, A.CALDERON, J.J. MARTINEZ, S. RODRIGUEZ, J. ALCOCER. 1989. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. **Environ. Res.** 50: 289 – 295.
- RIVERA, F., F. LARES, E. RAMIREZ, P. BONILLA, S. RODRIGUEZ, A. LABASTIDA, R. ORTIZ, D. HERNANDEZ. 1991. Pathogenic *Acanthamoeba* isolated during an atmospheric survey in Mexico City. **Rev. Infect. Dis.** 13: S388 – S389.
- RIVERA, W. L., ADAO, D. E. 2009. 18S ribosomal DNA genotypes of *Acanthamoeba* species isolated from contact lens cases in the Philippines. **Parasitol Res.** 105(4):1119-24.
- RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. **Crit. Rev. Microbiol.** 20: 225 - 241.
- ROWBOTHAM, T.J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. **J. Clin. Pathol.** 33:1179-1183.

- ROWEN, J.L., C.A. DOERR, H. VOGEL, C.J. BAKER. 1995. *Balamuthia mandrillaris*: a newly recognized agent for amebic meningoencephalitis. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 14: 705 – 710.
- SAMBROOK, J., FRISTSCH, E. F., MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning. A Laboratory manual, second. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 74(12):5463-7.
- SANGRUCHI, T., A.J. MARTINEZ, G.S. VISVESVARA. 1994. Spontaneous granulomatous amebic encephalitis: report of four cases from Thailand. Southeast Asian. J. Trop. Med. **Public Health.** 25: 309 – 373.
- SARPARANTA, K., LINDBOHM, N., TERVO, T., TUISKU, I., JOKIRANTA. S. 2009. *Acanthamoeba* keratitis. **Duodecim.** 125(15):1639-46.
- SCHAUMBERG, D. A.; SNOW, K. K.; DANA, M. R. 1998. The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: Where do we stand? **Cornea.** 17: 3 – 10.
- SCHEID P., HAURÖDER B., MICHEL R., 2010. Investigations of an extraordinary endocytobiont in *Acanthamoeba* sp.: development and replication. **Parasitol Res.** 106(6):1371-7.
- SCHROEDER, J. M., BOOTON, G. C., HAY, J., NISZL, I. A., SEAL, D.V., MARKUS, M. B., FUERST, P. A., BYERS, T. J. 2001. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. **J. Clin. Microbiol.** 39(5): 1903 – 1911.
- SCHUSTER, F. L. 2002. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. **Clinical Microbiology Reviews.** 15 (3): 342-354.
- SCHUSTER, F.L., VISVESVARA, G.S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for parasitology.** 34: 1001- 1027.

- SHARMA P. P., GUPTA, P., MURALI, M. V., RAMACHANDRAN, V. G. 1993. Primary amebic meningoencephalitis caused by *Acanthamoeba*: successfully treated with cotrimoxazole. **Indian Pediatr.** 30(10):1219-22.
- SHI, W., LIU, M., GAO, H., LI, S., XIE, L. 2009. Perioperative treatment and prognostic factors for penetrating keratoplasty in *Acanthamoeba* keratitis unresponsive to medical treatment. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.** 247(10):1383-8.
- SINGHAL, T., A. BAJPAI, V. KALRA, S.K. KABRA, J.C. SAMANTARAY, G. SATPATHY, A.K. GUPTA. 2001. Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 20: 623 – 627.
- SLAPETA, J., STEJSKAL, F., KEITHLY, J. S., 2003. Characterization of S-adenosylmethionine synthetase in *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). **FEMS Microbiol Lett.** 225(2):271-7.
- STADEN, R., JUDGE, D.P., BONFIELD, J.K. 2001. Sequence assembly and finishing methods. **Methods of Biochemical Analysis.** 43: 303-22.
- STAPLETON, F., OZKAN, J., JALBERT, I., HOLDEN, B. A., PETSOGLU, C., MCCLELLAN, K. 2009. Contact Lens-Related *Acanthamoeba* Keratitis. **Optom Vis Sci.** 7.
- STEHR-GREEN, J.K., T.M. BAILEY, G.S. VISVESVARA. 1989. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. **Am. J. Ophthalmol.** 107: 331- 336.
- STOTHARD, D.R., SCHROEDER-DIEDRICH, J.M., AWWAD, M.H., GAST, R.J., LEDEE, D.R., RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S., DEAN, C.L., FUERST, P.A., BYERS, T.J. 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **J. Euk. Microbiol.** 45: 45–54.
- TANAKA, Y., SUGURI, S., HARADA, M., HAYABARA, T., SUZUMORI, K., OHTA, N. 1994. *Acanthamoeba*-specific human T-cell clones isolated from healthy individuals. **Parasitol Res.** 80(7):549-53.

- THOM, S., D. WARHURST, B.S. DRASAR. 1992. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. **J. Med. Microbiol.** 36: 303 – 306.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acid Research.** 22: 4673-4680.
- TORNO, M.S., JR., R. BABAPOUR, A. GUREVITCH, M. D. WITT. 2000. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. **J. Am. Acad. Dermatol.** 42: 351-354.
- TRNKOVÁ, K., BIELIKOVÁ, A., IZÁK, M., KLEMENT, C. 2009. Diagnosing of *Acanthamoeba* keratitis. **Cesk Slov Oftalmol.** 65(5):155-60.
- VAN KLINK, F., ALIZADEH, H., HE, Y., MELLON, J.A., SILVANY, R.E., MCCULLEY, J.P., NIEDERKORN, J.Y. 1993. The role of contact lenses, trauma, and Langerhans cells in a Chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. **Investig. Ophthalmol. Visual Sci.** 34:1937–1944.
- VISVESVARA, G. S. 1991. Classification of *Acanthamoeba*. **Rev Infect Dis.** 5:S369-372
- VISVESVARA, G. S., MOURA, H., SCHUSTER, F. L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 50(1):1-26.
- VISVESVARA, G. S., SHOFF, M. E., SRIRAM, R., BOOTON, G. C., CRARY, M., FUERST, P. A., HANLEY, C. S., GARNER, M. M., 2010. Isolation, morphologic, serologic and molecular identification of *Acanthamoeba* T4 genotype from the liver of a Temminck's tragopan (*Tragopan temminckii*). **Vet Parasitol.** 6.
- VISVESVARA, G.S., SCHUSTER,F.L., MARTINEZ, A.J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. J. Eucaryot. **Microbiology.** 40 (4): 504-14.
- VISVESVARA, G.S., STHERR-GREEN, J. 1990. Epidemiology of free-living ameba infection. **J. Protozool.** 37: 25-33.

- WALOCHNIK, J., A. HASSL, K. SIMON, G. BENYR, H. ASPOCK, 1999. Isolation and identification by partial sequencing of the 18S ribosomal gene of free-living amoebae from necrotic tissue of *Basilliscus plumifrons* (Sauria: Iguanidae). **Parasitol. Res.** 85: 601 – 603.
- WALOCHNIK, J., OBWALLER, A., ASPÖCK, H. 2000. Correlations between Morphological, Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied and Environmental Microbiology**. 66 (10): 4408-4413.
- WALOCHNIK, J., OBWALLER, A., ASPÖCK, H. 2001. Immunological interstrain crossreactivity correlated to 18S rDNA sequence types in *Acanthamoeba* spp. **Int. J. Parasitol.** 31: 163 – 167.
- XUAN, Y. H., CHUNG, B. S., HONG, Y. C., KONG, H. H., HAHN, T. W., CHUNG, D. I. 2008. Keratitis by *Acanthamoeba triangularis*: report of cases and characterization of isolates. **Korean J Parasitol.** 46(3):157-64.
- YU, H. S., HWANG, M. Y., KIM, T. O., YUN, H. C., KIM, T. H., KONG, H. H., CHUNG, D. I. 1999. Phylogenetic relationships among *Acanthamoeba* spp, based on PCR – RFLP analyses of mitochondrial small subunit rRNA gene. **Korean. J. Parasitol.** 37(3): 181 – 188.
- ZHAO, G., SUN, S., ZHAO, J., XIE, L. 2010. Genotyping of *Acanthamoeba* isolates and clinical characteristics of patients with *Acanthamoeba* keratitis in China. **J Med Microbiol.** 59(Pt 4):462-6.
- ZHOU, X., ELMOSE, J., CALL, D. R., 2007. Interactions between the environmental pathogen *Listeria monocytogenes* and a free-living protozoan (*Acanthamoeba castellanii*). **Environ Microbiol.** 9(4):913-22.

ANEXO 1

Meio ágar soja – AS (FORONDA, 1979)

Reagentes	Quantidades
Farinha de soja	2,0 g
Ágar bacteriológico	15,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL

Modo de preparo:

1. Preparar uma infusão de água destilada e farinha de soja e deixar em repouso por 24 horas.
2. Filtrar a infusão em papel filtro.
3. Acrescentar o ágar e fechar o frasco.
4. Autoclavar por 20 minutos.
5. Distribuir o meio em placas de petri ou tubos e esperar solidificar. Os tubos devem ser mantidos inclinados.
6. Na hora do uso, acrescentar de 100 a 200 µL de suspensão de *Escherichia coli* vivas ou inativadas.

ANEXO 2

Meio PYG modificado de Rowbotham (1980)

Reagentes	Quantidades
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,98 g
CaCl ₂	0,06 g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O	1,0 g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g
Na ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,34g
Glicose	9,0 g
Proteose Peptona	20,0 g
Extrato de levedo	2,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000mL

Modo de preparo:

- 1) Dissolver os sais separadamente em 100 mL de água.
- 2) Reunir as soluções em um frasco maior e acrescentar os demais ingredientes, sob agitação
- 3) Ajustar o pH para 6,5 e completar o volume
- 4) Autoclavar durante 20 minutos e esperar esfriar
- 5) Acrescentar 1mL de penicilina 500.000 U/mL ou 0,25 mL de estreptomicina 2,5 mg/mL

Obs: Se for acrescentar soro bovino fetal (SBF), separar uma alíquota e misturar 5 mL de SBF inativado e estéril à cada 45 mL de meio

(Adaptado de CROZETTA et al, 2007)

ANEXO 3

Sequências nucleotídicas dos isolados clínicos de *Acanthamoeba* determinadas pelo sequenciamento parcial do gene 18S r DNA.

ISOLADO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA
AR	ACCGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGG GATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGAT TAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATGAAAGATTA ACTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACG ATCAGATAACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAA CACCACCATCGGCGCGGTCTGCTTGGCGTCTCGGTCTTCACGGGGCCGGGGCGCGGGGGCGGCTTAC CCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCT
ALX	ATGGGCCCAGATCGTTTACCGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACC GAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGA GGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTG GATTTATGAAAGATTAACITCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTT AGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAG ACGTTGAATACAAAAACACCACCATCGGTGCGGTCTCGTCTTCACGGGGCCGGGGCGCGGGGGCGGCTT GGTGGCTTAGCCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCTAGCACTTTGTGAGAAAGTTTTT
LG	TACCGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATG GGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATGAAAGATT AACTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGAC GATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAA ACACCACCATCGGCGCGGTCTGCTTGGCGTCTCGGTCTTCACGGGGCCGGGGCGCGGGGGCGGCTT AGCCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCTAGCAC
WAL	ATTGGCCCAGAANGTTTACCGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACC GAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGA GGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTG GATTTATGAAAGATTAACITCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTT AGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAG ACGTTGAATACAAAAACACCACCATCGGCGCGGTCTGCTTGGCGTTCACGGCTGGCGGCGC GAGGGCGGTAGAGCCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCTAGCANNTTGTGAGAATTNTT
AP2	AAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGG AATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGG ATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATGAAAGATTAACITCTGC GAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA CCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAAACACCACCA TCGGTGCAGTCTGCTTGGCGTCTGCTTTCGGCCGGCGCGGGGGCGGCTT

AR, ALX, LG, WAL: Isolados clínicos obtidos de lesão de ceratite amebiana de pacientes do Espírito Santo; **AP2:** Isolado clínico obtido de lesão de ceratite amebiana (ATCC30461);

ANEXO 4

Sequências nucleotídicas dos isolados ambientais de *Acanthamoeba* determinadas pelo sequenciamento parcial do gene 18S r DNA.

ISOLADO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA
AR11	ACCGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGG GATAATGGAATAGGACCCTGTCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGAT TAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATGAAAGATTA ACTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACG ATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAA CACCACCATCGGTGCGGTCTCCTTGGCGTCGGTTTCGGCCGGCGCGGGGGCGGCTTACCCGGTGGCAC CGGTGAATGACTCCCT
AR14	ACCGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGG GATAATGGAATAGGACCCTGTCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGAT TAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATGAAAGATTA ACTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACG ATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAA CACCACCATCGGTGCGGTCTCCTTGGCGTCGGTTTCGGCCGGCGCGGGGGCG
AR15	CAAGTCGTTTACCGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTCTCTGCCACCGAATAC ATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGACACGCGAGGACCAG GGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTAT GAAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGA TCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTG AATACAAAACACCACCATTGGTGCGGTCTCCTTGGCATTGTTGGTCGTGGCGCGAGTCCACGGCCAGGT GCGGGG
OPH	AAAAAGTTGGCCAGNANNGTTTACCGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTC TGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGGC ACGCGAGGACCAGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAA ATTCTTGGATTTATGAAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAAC GAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGA TTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGTGCGGTCTCCTTGGCGCGTCGCGGCTTGCCGCG GCGTGCGAGGGCGGTTTAGCCTGATGGCATCNGTGAATGACTCCCTAG
AP4	CGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATTCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGA TAATGGAATAGGACCCTGTCTCCTCTTTTCAGTTGGTTAATTTATGTGCGAGGATCAGGGTAATGATT AATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATGAAAGATTAA CTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGA TCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAAC ACCGCTAAAGATAATTCATTATATGGCTTACGGCTGTATAGTGTGTTAGTTCATGGTGAATGAC TCCCCTAGCA

AR11, AR12, AR14, AR15: Isolados ambientais obtidos de poeira da casa de um dos pacientes com ceratite amebiana do Espírito Santo; **OPH:** Isolado ambiental obtido de hospital. **AP4:** Isolado ambiental obtido de água fresca (ATCC30872).